

Attorney's Docket No. 038827.307263

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

in re: Gellissen et al. Confirmation No.: 5408  
Appl. No.: 10/042,059  
Filed: October 25, 2001  
For: NUCLEIC ACID MOLECULE, COMPRISING A NUCLEIC ACID CODING  
FOR A POLYPEPTIDE WITH CHORISMATE MUTASE ACTIVITY

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**SUBMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT**

To complete the requirements of 35 U.S.C. § 119, enclosed is a certified copy of German Priority Application No. 199 19 124.7, filed April 27, 1999.

Respectfully submitted,

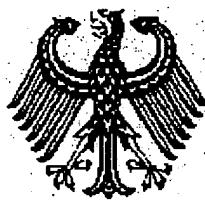
Andrew T. Meunier  
Registration No. 40,726

**Customer No. 00826**  
**Alston & Bird LLP**  
Bank of America Plaza  
101 South Tryon Street, Suite 4000  
Charlotte, NC 28280-4000  
Tel Atlanta Office (404) 881-7000  
Fax Atlanta Office (404) 881-7777

"Express Mail" mailing label number EV 700810492 US  
Date of Deposit February 14, 2006

I hereby certify that this paper or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to:  
Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 199 19 124.7

**Anmeldetag:** 27. April 1999

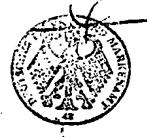
**Anmelder/Inhaber:** Rhein Biotech Gesellschaft für neue Biotechnologische Prozesse und Produkte mbH, 40595 Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodierende Nukleinsäure

**IPC:** C 12 N, C 07 M, C 07 K

**Die angeschaffteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 7. Februar 2006  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag



## Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodierende Nukleinsäure

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität und Derivate davon kodierende Nukleinsäure, wobei die Derivate wenigstens 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweisen. Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuremoleküle enthaltende Vektoren, Nukleinsäuremoleküle umfassende Wirtszellen und Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden mit Chorismatmutase-Aktivität. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Polypeptide mit Chorismatmutase-Aktivität und Antikörper, die diese spezifisch erkennen. Die Erfindung betrifft außerdem Verfahren zur Herstellung von auxotrophen Hefestämmen mit Hilfe der Nukleinsäuremoleküle und deren Verwendung in Verfahren zur rekombinanten Expression heterologer Gene.

Hefen als einzellige, eukaryontische Mikroorganismen sind problemlos kultivierbar und haben den großen Vorteil, leicht genetisch manipulierbar zu sein. Zudem können sie rekombinante Proteine entsprechend den aus höheren Organismen bekannten Mustern prozessieren und modifizieren. Sie enthalten, soweit bisher bekannt, keine pathogenen Substanzen und bieten sich daher auch für die Produktion therapeutischer Proteine an. So wurde beispielsweise der erste durch heterologe Genexpression produzierte Impfstoff, das Hepatitis B-Vakzin, in der gut charakterisierten Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimiert (Lepetic et al., 1996).

Zwar ermöglicht *S. cerevisiae* die Produktion vieler verschiedener Proteine (zur Übersicht siehe Gellissen and Hollenberg, 1997), es bestehen jedoch auch einige begrenzende Eigenschaften. So beträgt beispielsweise der maximale Anteil an heterologem Protein ungefähr 1-5 % des Gesamtproteingehaltes der Zelle (Buckholz and Gleeson, 1991).

Verschiedene andere Hefen, wie etwa *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* und auch *Hansenula polymorpha*, wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Expressionssystem charakterisiert und mit *S. cerevisiae* verglichen (Müller

et al., 1998). Alle diese Hefen zeigten eine deutlich stärkere Sekretion an aktivem Protein als *S. cerevisiae*, wobei die heterologe Genexpression abhängig vom jeweiligen Gen, jedoch unabhängig vom Donororganismus war. Grundsätzlich erweisen sich methylo-trophe Hefen als attraktive Organismen für die Produktion rekombinanter Proteine. Man unterteilt die methylo-trophen Hefen in die vier Gattungen *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* und *Torulopsis*, die alle die Fähigkeit besitzen, Methanol, Methylamine, Formaldehyd oder Formiat als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen.

Zu der verhältnismäßig kleinen Gruppe der methylo-trophen Hefen gehört u. a. die Hefe *Hansenula polymorpha* aus der Familie der *Saccharomycetaceae* (Lodder, 1970). *Hansenula polymorpha* vergärt Glukose nicht unter aeroben Bedingungen, ist also Crabtree-negativ (Verduyn et al., 1992) und zählt mit einem Wachstumstemperaturopimum von 37 °C zu den thermotoleranten Hefen; sie stellt damit eine Ausnahme unter den methylo-trophen Gattungen dar. Das natürliche Habitat der methylo-trophen Hefen sind an organischem Material reiche Standorte.

Bisher wurden nur wenige Gene der Hefe *Hansenula polymorpha* kloniert und charakterisiert (Hansen and Hollenberg, 1996). Die Ähnlichkeiten dieser Gene mit den homologen Genen in *Saccharomyces cerevisiae*, soweit vorhanden, sind relativ begrenzt (Dobson et al., 1982). Die Schlüsselenzyme im methylo-trophen Stoffwechsel sind die Enzyme Methanoloxidase (MOX), Dihydroxyacetonsynthase (DAS) und Formiatdehydogenase (FMD), deren von sehr stark regulierten Promotoren gelenkte Expression vielseitig nutzbare Möglichkeiten der heterologen Genexpression eröffnet. Diese Tatsachen machen *Hansenula polymorpha* zu einem industriell interessanten Organismus (Gellissen et al., 1994).

Bisher sind erst zwei auxotrophe Stämme von *H. polymorpha* verfügbar, deren Transformation durch funktionelle Komplementation des *ura3*- bzw. *leu2*-Mangels selektioniert werden kann. Die Bereitstellung weiterer Transformationssysteme, bestehend aus auxotrophen Stämmen und zur Komplementation der Auxotrophie fähigen Nukleinsäuren scheiterte bislang daran, daß geeignete zur Komplementation fähige Gene nicht zur Verfügung stehen. Es sind zwar eine Reihe von Genen aus dem Aminosäure- oder Nu-

kleinsäurebiosyntheseweg der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bekannt, doch hat sich in der Vergangenheit gezeigt, daß die Unterschiede zwischen den Genen der Bäckerhefe und den methylotrophen Hefen zum Teil beachtlich sind. Daher kann generell nicht erwartet werden, daß ein *S. cerevisiae*-Gen zur Komplementation einer Auxotrophie in einer methylotrophen Hefe geeignet ist; noch kann erwartet werden, daß Gene aus einer methylotrophen Hefe zur Komplementation einer Auxotrophie in *S. cerevisiae* fähig sind.

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Gen aus *H. polymorpha* bereitzustellen, das als selektierbarer Marker für die Komplementation bei Transformation von entsprechenden auxotrophen Hefestämmen dienen kann. Eine

weitere Aufgabe liegt in der Bereitstellung von Vektoren und Wirtszellen, die das Gen enthalten. Weiterhin sollen das von dem Gen kodierte Polypeptid und Antikörper, die das Polypeptid spezifisch erkennen, bereitgestellt werden. Schließlich sollen entsprechende auxotrophe Stämme bereitgestellt werden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodierende Nukleinsäure oder deren Gegenstrang, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus

- (a) einer Nukleinsäure mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen DNA-Sequenz bzw. der ihr entsprechenden RNA-Sequenz;
- (b) einer Nukleinsäure, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäure nach (a) hybridisiert;
- (c) einer Nukleinsäure, die aufgrund des genetischen Codes zu den unter (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert ist;
- (d) einer Nukleinsäure, die mit einer der in (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuren hybridisiert und deren Gegenstrang für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodiert;
- (e) einer Nukleinsäure, die wenigstens 60 % homolog zu einer der in (a) bis (d) angegebenen Nukleinsäuren ist;

- (f) einer Variante der in (a) bis (e) angegebenen Nukleinsäuren, wobei die Variante gegenüber den in (a) bis (e) angegebenen Nukleinsäuren Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweist;
- (g) einem Fragment einer der in (a) bis (f) angegebenen Nukleinsäuren;
- (h) einer Kombination mehrerer der unter (a) bis (g) angegebenen Nukleinsäuren,

wobei das von der Nukleinsäure oder deren Gegenstrang kodierte Polypeptid wenigstens 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweist.

In Mikroorganismen und Pflanzen verläuft die Biosynthese aromatischer Aminosäuren zunächst über 7 enzymkatalysierte Reaktionen des Shikimatweges von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat hin zum Chorismat (Figur 1). Chorismat ist das Substrat des ersten Verzweigungspunktes. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird, ausgehend von diesem Verzweigungspunkt, einerseits durch das Enzym Anthranilatsynthase (E.C. 4.1.3.27) Anthranilat und andererseits durch das Enzym Chorismatmutase (E.C. 5.4.99.5) Prephenat gebildet. Aus Prephenat wird über weitere Zwischenprodukte schließlich Tyrosin und Phenylalanin gebildet (Braus, 1991). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird die Chorismatmutase durch das ARO7-Gen (Schmidheini et al., 1989) kodiert, welches auf dem Chromosom XVI lokalisiert ist. ARO7 kodiert eine 0,95 kb mRNA und enthält ein 771 bp großes offenes Leseraster, das für ein aus 256 Aminosäuren bestehendes Protein kodiert.

Im nachfolgenden werden einige Begriffe näher erläutert, um klarzustellen, wie sie im Zusammenhang der vorliegenden Anmeldung verstanden werden sollen.

Der Begriff "Chorismatmutase", so, wie er nachfolgend in der Beschreibung verwendet wird, umfaßt vollständige Chorismatmutase, Chorismatmutase-Fragmente, Chorismatmutase-Mutanten und Fusionsproteine davon. Als erfindungsgemäß werden Polypepti-

de betrachtet, die wenigstens 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweisen.

„Chorismatmutase-Aktivität“ bedeutet die katalytische Umsetzung von Chorismat zu Prephenat als Teil der Phenylalanin- und Tyrosin-Biosynthese, die durch das Enzym Chorismatmutase (E.C. 5.4.99.5) katalysiert wird. Die Chorismatmutase-Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptides kann beispielsweise spektralphotometrisch durch die Säure-katalysierte Umsetzung des Produktes Prephenat zu Phenylpyruvat, welches bei 320 nm absorbiert, gemessen werden (Schmidheini et al., 1989).

Ein „prototropher“ Mikroorganismus benötigt für sein Wachstum bzw. seine Vermehrung nur einfache Nährstoffe (Kohlenstoff und Stickstoff) und Mineralien, kann jedoch alle benötigten Aminosäuren selbst aufbauen. Dementsprechend ist er in der Lage, auf „Minimalmedium“ zu wachsen.

Im Gegensatz dazu benötigen „auxotrophe“ Mikroorganismen zusätzliche Faktoren, beispielsweise Aminosäuren, die sie auf Grund eines Defektes im Biosyntheseweg für den betreffenden Faktor nicht selbst synthetisieren können. In Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist die Auxotrophie vorzugsweise eine Phenylalanin/Tyrosin-Auxotrophie, die durch die verringerte oder fehlende Chorismatmutase-Aktivität z. B. eines erfindungsgemäß hergestellten auxotrophen Hefestammes verursacht wird.

„Minimalmedium“ bedeutet eine Nährstofflösung, die nur die Bestandteile enthält, die zum Wachstum eines prototrophen Mikroorganismus notwendig sind. In Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist das Minimalmedium vorzugsweise ein Phenylalanin- und/oder Tyrosin-freies Medium, wodurch die Selektion der Phenylalanin/Tyrosin-auxotrophen Form des Mikroorganismus gegenüber der prototrophen Form des Mikroorganismus ermöglicht wird.

„His-Tag“ bedeutet eine Sequenz von wenigstens 6 Histidin-Aminosäuren, die durch entsprechende Klonierung und Fusion mit einer exprimierbaren Sequenz zu einem Fu-

sionsprotein mit wenigstens 6 His-Resten am NH<sub>2</sub>-Terminus führt, das leicht durch Komplexierung mit einer Ni<sup>2+</sup>-Säule aufgereinigt werden kann.

Unter einem „heterologen Gen“ ist der kodierende Bereich eines Strukturgens zu verstehen, der entweder nicht unter der Kontrolle des eigenen (homologen) Promotors oder nicht in dem Organismus, aus dem er abgeleitet ist, oder weder unter der Kontrolle des eigenen Promotors noch im ursprünglichen Organismus exprimiert wird.

„Klonierung“ soll alle im Stand der Technik bekannten Klonierungsmethoden umfassen, die hier zum Einsatz kommen könnten, die jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

Unter „rekombinanter Expression in einer geeigneten Wirtszelle“ sollen alle im Stand der Technik bekannten Expressionsmethoden in bekannten Expressionssystemen verstanden werden, die hier zum Einsatz kommen könnten, jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

Den Erfindern ist es erstmals gelungen, durch Selektionierung und Sequenzierung eines genomischen Klons aus *Hansenula polymorpha*, der nach Transformation zur funktionellen Komplementation der Phenylalanin/Tyrosin-Auxotrophie des *Saccharomyces cerevisiae aro7Δ*-Deletionsstammes fähig ist, eine erfindungsgemäße Nukleinsäure zu identifizieren und mit dieser Nukleinsäure auxotrophe Mutanten methylo tropher Hefen herzustellen. Damit wird ein weiteres dringend benötigtes Transformationssystem für methylo trophe Hefen bereitgestellt, das die gezielte Selektion transformierter Hefe mit einfachen Mitteln ermöglicht.

Die Erfinder haben eine genomische Bank von *H. polymorpha* durch Klonierung von Restriktionsfragmenten chromosomaler *H. polymorpha*-DNA in einen Shuttle-Vektor hergestellt, wobei der Shuttle-Vektor eine hohe Kopienzahl in Hefe aufweist und die *Hansenula*-Gene in *S. cerevisiae* unter der Kontrolle ihres endogenen Promotors exprimiert werden. Diese genomische Bank wurde zur Komplementation auxotropher Sac-

*charomyces cerevisiae*-Stämme verwendet, obwohl es unbekannt wär, daß der jeweils endogene Promotor des *Hansenula polymorpha*-Gens in *S. cerevisiae* aktiv ist.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß das Chorismatmutase-Gen aus *Hansenula polymorpha* in *S. cerevisiae* transkribiert und translatiert wird und enzymatisch aktiv ist.

Daß gerade das Chorismatmutase-Gen in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden konnte, war aus mehreren Gründen nicht zu erwarten.

So war unbekannt, ob das Chorismatmutase-Gen aus *H. polymorpha* Introns enthält und ob der *S. cerevisiae*-Spleißen-Apparat zur korrekten Prozessierung der möglichen Prä-RNA in der Lage ist. Nunmehr konnte gezeigt werden, daß das Chorismatmutase-Gen aus *H. polymorpha* keine Introns aufweist.

Weiterhin war nicht vorauszusehen, daß das Translationsprodukt in *S. cerevisiae* korrekt gefaltet und gegebenenfalls assembliert werden kann, um eine ausreichend aktive Chorismatmutase zu ergeben, die in der Lage ist, die Reaktion von Chorismat zu Prephenat zu katalysieren. Die fehlende Vorhersagbarkeit wird gestützt durch die Tatsache, daß *HLEU2*, das *LEU2*-Homologe aus *H. polymorpha*, nicht in der Lage ist, eine entsprechende Mutation in *S. cerevisiae* zu komplementieren (Agaphonov et al., 1994).

Ferner war nicht bekannt, daß die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin in *H. polymorpha* überhaupt die Umsetzung von Chorismat zu Prephenat mit Hilfe des Enzyms Chorismatmutase umfaßt. Tatsächlich ist bekannt, daß es bei der Biosynthese aromatischer Aminosäuren erhebliche Unterschiede gibt. So wird in einigen Cyanobakterien Prephenat zunächst durch Transaminierung zu Arogenat umgewandelt. Dieser Weg wird auch von Pflanzen genutzt (Jensen und Stenmark, 1975) und ist in der Natur weiter verbreitet als der Hydroxyphenylpyruvat-/Phenylpyruvatweg, der von *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli* genutzt wird.

*charomyces cerevisiae*-Stämme verwendet, obwohl es unbekannt war, daß der jeweils endogene Promotor des *Hansenula polymorpha*-Gens in *S. cerevisiae* aktiv ist.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß das Chorismatmutase-Gen aus *Hansenula polymorpha* in *S. cerevisiae* transkribiert und translatiert wird und enzymatisch aktiv ist.

Daß gerade das Chorismatmutase-Gen in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden konnte, war aus mehreren Gründen nicht zu erwarten.

So war unbekannt, ob das Chorismatmutase-Gen aus *H. polymorpha* Introns enthält und ob der *S. cerevisiae*-Spleißing-Apparat zur korrekten Prozessierung der möglichen Prä-RNA in der Lage ist. Nunmehr konnte gezeigt werden, daß das Chorismatmutase-Gen aus *H. polymorpha* keine Introns aufweist.

Weiterhin war nicht vorauszusehen, daß das Translationsprodukt in *S. cerevisiae* korrekt gefaltet und gegebenenfalls assembliert werden kann, um eine ausreichend aktive Chorismatmutase zu ergeben, die in der Lage ist, die Reaktion von Chorismat zu Prephenat zu katalysieren. Die fehlende Vorhersagbarkeit wird gestützt durch die Tatsache, daß *HLEU2*, das *LEU2*-Homologe aus *H. polymorpha*, nicht in der Lage ist, eine entsprechende Mutation in *S. cerevisiae* zu komplementieren (Agaphonov et al., 1994).

Ferner war nicht bekannt, daß die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin in *H. polymorpha* überhaupt die Umsetzung von Chorismat zu Prephenat mit Hilfe des Enzyms Chorismatmutase umfaßt. Tatsächlich ist bekannt, daß es bei der Biosynthese aromatischer Aminosäuren erhebliche Unterschiede gibt. So wird in einigen Cyanobakterien Prephenat zunächst durch Transaminierung zu Arogenat umgewandelt. Dieser Weg wird auch von Pflanzen genutzt (Jensen und Stenmark, 1975) und ist in der Natur weiter verbreitet als der Hydroxyphenylpyruvat-/Phenylpyruvatweg, der von *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli* genutzt wird.

Die im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül enthaltene Nukleinsäure kann genomische DNA, cDNA oder synthetische DNA sein, wobei unter einer synthetischen DNA-Sequenz auch eine solche verstanden wird, die modifizierte Internukleosid-Bindungen enthält. Weiter kann es sich bei der Nukleinsäure um eine RNA-Sequenz handeln, was z.B. für die Expression mittels rekombinanter Vektorsysteme erforderlich sein kann. Die Nukleinsäure gemäß (b) ist beispielsweise erhältlich durch Verwenden einer nachweisbar markierten Sonde, die einer der unter (a) angegebenen Sequenzen oder einem Fragment bzw. deren Gegenstrang entspricht, zum Screening von cDNA- bzw. genomischen DNA-Bibliotheken aus Mikroorganismen. Vorzugsweise gehört der Mikroorganismus, aus dem die Bank erstellt wird, zu einer Gattung ausgewählt aus: *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* und *Yarrowia*. Insbesondere gehört der Mikroorganismus zu einer Species ausgewählt aus: *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* und *Yarrowia lipolytica*. Die Identifizierung positiver cDNA- bzw. genetischer DNA-Klone erfolgt dabei gemäß Standardverfahren. Vgl. Maniatis et al., Molecular Cloning (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die unter (b) oder (d) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind z.B. Inkubation bei 65°C über Nacht in 7 % SDS, 1 % BSA, 1 mM EDTA, 250 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) und nachfolgendes Waschen bei 65 °C mit 2 x SSC; 0,1 % SDS.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren bereitgestellt, die wenigstens 60 % homolog zu der in (a) angegebenen Nukleinsäuresequenz sind. Bevorzugt sind die Nukleinsäuren wenigstens 80 % homolog zu der in (a) angegebenen Nukleinsäuresequenz. Besonders bevorzugt sind die Nukleinsäuren wenigstens 90 % oder 95 % homolog zu der in (a) angegebenen Nukleinsäure.

Erfindungsgemäß bedeutet der Ausdruck „Homologie“ Homologie auf DNA-Ebene, die mittels bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic lo-

cal alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine Kombination mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen Nukleinsäuren, die durch dem Fachmann bekannte Fusion und gegebenenfalls Klonierung erhalten werden können. Diese Kombinationen können z. B. für die Erzeugung immunogener Konstrukte von besonderem Interesse sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das von der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodierte Polypeptid wenigstens 50 % der Chorismatmutaseaktivität der Chorismatmutase SEQ ID NO: 2 auf. Besonders bevorzugt ist es, daß das Polypeptid wenigstens 75 % der Chorismatmutaseaktivität gemäß SEQ ID NO: 2 aufweist. Die Chorismatmutaseaktivität wird dabei, wie bereits angegeben, gemäß Schmidheini et al., 1989 gemessen.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt das Nukleinsäuremolekül einen zur Expression geeigneten Promotor, wobei die Nukleinsäure unter der Kontrolle des Promotors steht. Die Wahl des Promotors hängt vom zur Expression verwendeten Expressionssystem, insbesondere der Wahl des Wirtsorganismus ab. Erfindungsgemäß bevorzugt sind sowohl konstitutive Promotoren wie PGK- und G3PDH- Promotoren als auch induzierbare Promotoren wie GAL4, ADH2 und der Cu-Metallothionein-Promotor (Überblick in Recombinant Gene Expression Protocols in Methods in Molecular Biology Vol. 63, Herausgeber R.S. Tuan, Kapitel III; Schena, M. et al. (1991) Vectors for constitutive and inducible expression in yeast, Methods in Enzymol. 194, 389-398). Von der Erfindung wird ferner die Verwendung von Säuger-Glucocorticoid-Response-Elementen (GRE) zur Erhöhung der Transkription in Betracht gezogen (Schena et al., Science 241 (1988), 965-967).

Weiterhin bevorzugt sind die Promotoren des Methanolstoffwechsels von methylotrophen Hefen, insbesondere *Hansenula polymorpha*. Die Gene für die Enzyme des Methanolstoffwechsels in *Hansenula polymorpha* gehören zu den am stärksten exprimierten Genen in dieser Hefeart.

mierten und regulierten Genen, die bisher in Hefen beschrieben worden sind (Van der Klei et al., 1991). Die entsprechenden Proteine können bis zu 30% des Gesamtprotein-gehaltes des Zelle ausmachen (Janowicz et al., 1985; Ledeböer et al., 1985). Die Expression der Gene des Methanolmetabolismus' lässt sich einerseits durch Methanol induzieren, andererseits führt aber auch die Gegenwart von Glycerin zu einer Derepression. Auf diese Weise lassen sich also die starken Promotoren des Methanolmetabolismus auch unter methanolfreien Kulturbedingungen für die heterologe Genexpression nutzen.

Besonders bevorzugte Promotoren sind der in *H. polymorpha* beschriebene Methanoloxidase MOX-Promoter, der mit etwa 1,5 kb ungewöhnlich groß ist und zu den stärksten bisher beschriebenen Hefepromotoren gehört. Die Gegenwart von Glukose führt zu einer Repression des MOX-Promoters, jedoch lässt sich die Aktivität dieses Promoters durch Glycerin bzw. Methanol mehr als 1000fach steigern (Gödecke et al., 1994). Weiterhin besonders bevorzugt ist der Dihydroxyacetonsynthase DAS-Promotor (Ledeböer et al., 1985) und der FMD-Promotor (Europäisches Patent 299108).

In einer ferner bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Nukleinsäuremolekül weiterhin eine Signalpeptid-kodierende Nukleinsäuresequenz, die den Export des exprimierten Proteins gewährleistet, wobei die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäuresequenz vorzugsweise direkt 5' mit dem zu exprimierenden heterologen Gen verbunden ist.

Für die Sekretion und Modifikation vieler eukaryontischer Proteine ist es erforderlich, die Proteinsequenz am N-Terminus mit einer Signalsequenz zu fusionieren, um die Polypeptide in den Sekretionsapparat zu lenken. Hier kommen beispielsweise Komponenten aus dem *S. occidentalis*-Gen GAM1 (Dohmen et al., 1990) und aus einem hormonellen Gen der Krabbe *Carcinus maenas* (Weidemann et al., 1989) in Betracht, die für die Sekretion von Hirudin erfolgreich verwendet wurden (Weidemann et al., 1995).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Nukleinsäuremolekül ferner wenigstens ein Teil eines Vektors, insbesondere regulatorische Regionen, wobei der Vektor ausgewählt sein kann aus: Bacteriophagen wie  $\lambda$ -Derivaten, Plasmiden, Adeno-

viren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Viren und Retroviren, vorzugsweise MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus).

Besonders bevorzugt sind Hefe-Transformationsvektoren, wobei sowohl integrative Hefeplasmide (Ylp) als auch extrachromosomal Plasmidvektoren in Betracht kommen. Die extrachromosomal Plasmidvektoren unterteilen sich in episomale Hefeplasmide (YEp), replikative Hefeplasmide (YRp) und Hefecentromer-Plasmide (YCp) (vgl. Singh, K.K. und Heinemann, J.A., Kapitel 11 in Recombinant Gene Expression Protocols, supra). Weiterhin werden erfindungsgemäß künstliche Hefe-Chromosomen (YACs) als Expressionsvektoren in Betracht gezogen.

Besonders bevorzugte Vektoren sind weiterhin Hefe-Replikationsplasmide, die einen Replikationsursprung *ori* und eine Antibiotikaresistenz-Kassette enthalten, um in *E. coli* propagierte und selektioniert werden zu können. Des Weiteren tragen sie eine ARS-Sequenz zur chromosomal unabhängigen Replikation in der Hefezelle, wie etwa *HARS1* aus *H. polymorpha*, sowie einen metabolischen Hefeselektionsmarker, wie etwa *URA3* oder *HLEU2* (Gellissen und Hollenberg, 1997).

Es wurden bereits viele heterologe Proteine in *H. polymorpha* produziert (Gellissen und Hollenberg, 1997) und durch die Plazierung von mehr als einer Expressionskassette auf einem Transformationsvektor ist auch eine Co-Expression verschiedener Gene möglich (Gilbert et al., 1994).

Ferner ist ein Nukleinsäuremolekül bevorzugt, das zusätzlich eine His-Tag-kodierende DNA-Sequenz umfaßt, die bei Expression des Konstrukts zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag am NH<sub>2</sub>-Terminus des Proteins führt, welches die Aufreinigung des Proteins an einer Nickel-Säule durch Chelat-Bildung erleichtert.

Erfindungsgemäß werden Wirtszellen bereitgestellt, die das Nukleinsäuremolekül enthalten und die zur Expression des heterologen Gens geeignet sind. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen wie

*E. coli* oder *B. subtilis*, aus eukaryontischen Zellen wie Hefezellen, Insektenzellen und Säuerzellen, z.B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungsmuster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind.

Vorzugsweise gehört die Hefe zu einer Gattung ausgewählt aus: *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* und *Yarrowia*. Insbesondere gehört der Mikroorganismus zu einer Species ausgewählt aus: *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* und *Yarrowia lipolytica* (vergleiche Recombinant Gene Expression Protocols in Methods in Molecular Biology, supra).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiter ein Verfahren zum Herstellen eines Polypeptides mit Chorismatmutase-Aktivität. Dazu wird das erfindungsgemäß Nukleinsäuremolekül in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und das Protein aus der Wirtszelle oder dem Medium mittels üblicher Verfahren isoliert.

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Expression von DNA-Sequenzen bekannt; (vergleiche Recombinant Gene Expression Protocols in Methods in Molecular Biology, supra). Die Expression kann sowohl konstitutiv als auch induzierbar sein, wobei Induktoren wie beispielsweise IPTG und  $Zn^{2+}$  dem Fachmann bekannt sind. Das hergestellte Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kann, falls ein His-Tag an den  $NH_2$ -Terminus des Polypeptids fusioniert wurde, durch Chelat-Bildung an einer Nickel-Säule aufgereinigt werden. Vorzugsweise wird das Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität durch Ionenaustausch-Chromatographie und/oder Gelfiltrations-Chromatographie aufgereinigt. Die Durchführung dieser Maßnahmen ist dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäß hergestellte Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität modifiziert. Die Modifikationen umfassen hierbei die Di-, Oligo- und Polymerisierung des monomeren Ausgangsprodukts beispielsweise durch Quervernetzung, z.B. durch Dicyclohexylcarbodiimid oder Pegylierung oder Assoziation (self assembly). Weitere Modifikationen umfassen Seitenketten-

Modifikationen, beispielsweise von  $\epsilon$ -Amino-Lysin-Resten des Polypeptides, oder Ami-  
no- bzw. Carboxy-terminale Modifikationen. Weitere Modifikationen umfassen posttrans-  
lationale Ereignisse, z.B. die Glykosylierung oder die partielle oder vollständige Degly-  
kosylierung des Proteins.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erhaltene Polypeptid bei rekombinanter  
Expression in Prokaryonten oder Glykosylierungs-defizienten Eukaryonten nicht-  
glykosyliert. Ebenfalls in Betracht gezogen wird erfindungsgemäß ein Polypeptid mit  
Chorismatmutase-Aktivität, das durch rekombinante Expression in zur Glykosylierung  
fähigen Eukaryonten wie Hefezellen, Insektenzellen oder Säugerzellen, wie CHO-Zellen  
oder HeLa-Zellen, glykosyliert ist.

In einer weiteren Ausführungsform werden Polypeptide mit Chorismatmutase-Aktivität  
zur Verfügung gestellt, die eine Aminosäuresequenz umfassen, wobei die Aminosäure-  
sequenz von einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ko-  
diert wird.

Bevorzugt werden Polypeptide mit Chorismatmutase-Aktivität zur Verfügung gestellt, die  
die in SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz oder ein Fragment davon umfassen, das we-  
nistens 10 % der Chorismatmutase Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID  
NO: 2 aufweist, bevorzugt mehr als 50 % und besonders bevorzugt mehr als 75 %.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung Polypeptide mit Chorismatmuta-  
se-Aktivität, erhältlich durch das rekombinante Herstellungsverfahren oder Modifikatio-  
nen davon, bereit.

Weiterhin wird nicht-glykosyliertes und glykosyliertes Polypeptid mit Chorismatmutase-  
Aktivität, erhältlich durch Expression in zur Glykosylierung fähigen bzw. unfähigen Wirts-  
zellen, bereitgestellt. Je nach vorgesehener Verwendung des Polypeptids kann das Gly-  
kosylierungsmuster von Hefe, insbesondere methylotropher Hefe wie *Hansenula poly-*  
*morpha*, von COS- oder HeLa-Zellen bevorzugt sein.

Die Erfindung stellt ferner Antikörper bereit, die spezifisch mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität reagieren und erhältlich sind durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem Polypeptid. Polyklonale Antikörper können durch Immunisieren beispielsweise von Kaninchen, Mäusen oder Ratten und anschließendes Gewinnen von Antiseren erhalten werden. Monoklonale Antikörper können gemäß Standardverfahren durch Immunisieren von z.B. Mäusen, Gewinnen und Immortalisieren der Milzzellen und Klonieren der Hybridome, die für das Polypeptid spezifische Antikörper produzieren, erhalten werden.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Phenylalanin- und Tyrosin- auxotrophen Hefestammes bereit, umfassend das Zerstören des endogenen Chorismatmutase-Gens des entsprechenden Hefestammes, wobei die Mutante weniger als 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweist.

Erfindungsgemäß wird die homologe Rekombination als Verfahren zur Erzeugung der Mutante in Betracht gezogen. Die Disruption des Chorismatmutase-Gens durch homologe Rekombination beruht auf dem Ersetzen der endogenen chromosomalnen Kopie des Gens durch eine inaktivierte Kopie. Zur Herstellung eines Disruptionskonstruktes ist die Klonierung größerer Bereiche des zu zerstörenden Gens für die effiziente homologe Rekombination, vorzugsweise umfassend die 5'- und 3'-Bereiche, erforderlich. Die klonierten Bereiche sollten vorzugsweise wenigstens 2 kb umfassen.

Ein BgIII-Verdau genomicscher DNA aus *Hansenula polymorpha* und nachfolgende Southern-Blot-Analyse mit einer Chorismatmutase-spezifischen Sonde wie z.B. SEQ ID NO:3 ergab zwei Banden von 3,2 kb bzw. 3,0 kb. Die weitere Untersuchung zeigte, daß das 3,2 kb BgIII/BgIII-Fragment 690 bp von SEQ ID NO:3 umfaßt und den flankierenden 5'-Bereich enthält. Das 3,0 kb-BgIII-Fragment umfaßt 960 bp von SEQ ID NO:3 und enthält den flankierenden 3'-Bereich.

Die Isolierung und gerichtete Fusion des 3,2 kb Fragmentes mit dem 3,0 kb Fragment mit Hilfe dem Fachmann bekannter Standardverfahren führt zu einem 6,2 kb-Fragment, das das Chorismatmutase-Gen und große 5' und 3' flankierende Bereiche umfaßt.

Erfnungsgemäß wird die zu zerstörende Nukleinsäure, vorzugsweise eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO:1 oder eine dazu homologe Nukleinsäure, besonders bevorzugt die Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO:3 oder eine dazu homologe Nukleinsäure; insbesondere die Nukleinsäure das 6,2 kb genomische DNA-Fragment, eine dazu homologe Nukleinsäure oder Teile davon, umfassend, kloniert und durch Oligonukleotidaustausch mutiert, wobei die Mutation Additionen, Deletionen, Inversionen oder Substitutionen umfassen kann, die die Expression des Gens verringern oder zu einem inaktiven Translationsprodukt führen. Die Mutation erfolgt vorzugsweise wenigstens in einem Bereich oder Teilen davon, die ausgewählt sind aus den Nukleinsäurepositionen, korrespondierend zu den Aminosäurepositionen (SEQ ID NO:2) 10 bis 20, 154 bis 167, 192 bis 196 und 240 bis 247; diese Bereiche bilden mutmaßlich das katalytische Zentrum der Chorismatmutase. Es ist bevorzugt die für die Chorismatmutase kodierende Nukleinsäure durch Einklonieren eines längeren Oligonukleotides zu inaktivieren.

Vorzugsweise liegt das endogene Chorismatmutase-Gen als Einzelkopie-Gen vor.

Vorzugsweise umfaßt das zum Oligonukleotidaustausch verwendete Oligonukleotid wenigstens einen selektierbaren Marker wie eine Antibiotikaresistenz oder einen Stoffwechselmarker. Erfnungsgemäß werden sämtliche im Stand der Technik bekannten selektierbaren Marker umfaßt. Alternativ kann das Konstrukt auch synthetisch hergestellt werden. Das Konstrukt sollte zur effizienten homologen Rekombination eine Länge von wenigstens 2 kb aufweisen.

Das einklonierte Oligonukleotid ist 5' und 3' jeweils von Chorismatmutase-spezifischen Fragmenten flankiert, deren Sequenzen den in Anspruch 1(a) bis 1(h) angegebenen Sequenzen entsprechen oder zu diesen komplementär sind und mit der ursprünglichen chromosomalen Kopie hybridisieren können.

Das Konstrukt wird zur Herstellung einer Disruptionsmutante zunächst linearisiert. Anschließend wird der zur Erzeugung der Disruptionsmutante vorgesehene prototrophe Hefestamm mit dem Konstrukt transformiert. Sofern das Konstrukt einen selektierbaren Marker umfaßt, werden die Transformanden durch entsprechenden Selektionsdruck

selektioniert. Die Phenylalanin/Tyrosin-auxotrophen Transformanden werden durch Wachstum auf Phenylalanin-/Tyrosin-freiem Medium identifiziert.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren die Schritte:

- a) Herstellen eines Konstruktes, umfassend wenigstens zwei Fragmente einer zur homologen Rekombination geeignete Nukleinsäure gemäß Anspruch 1(a) bis (h); die eine zur homologen Rekombination nicht geeignete Nukleinsäure flankieren;
  - b) Transformieren von Zellen eines Hefestammes mit intaktem endogenen Chorismatmütase-Gen mit diesem Konstrukt
- und
- c) Identifizieren der Phenylalanin- und Tyrosin- auxotrophen Transformanden.

Besonders bevorzugt umfaßt das Konstrukt ferner ein Selektionsmarkergen. Weiterhin kann das Konstrukt eine oder mehrere Rekombinationsstellen umfassen, die vorzugsweise den selektierbaren Marker 5' und 3' flankieren und das Herausschneiden des selektierbaren Markers aus dem Konstrukt nach erfolgter Disruption des endogenen Chorismatmütase-Gens ermöglichen.

Vorzugsweise ist die Rekombinationsstelle loxP. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren ferner in Schritt b), daß die Zellen des Hefestammes in Schritt b) mit zur Expression von Cre-Rekombinase geeigneter Nukleinsäure in Kontakt gebracht werden, wodurch das Herausschneiden der selektierbaren Markergens mit Hilfe des loxP/Cre-Rekombinase-Systems ermöglicht wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Hefestamm *Hansenula polymorpha*.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen Phenylalanin- und Tyrosin-auxotrophen Hefestamm bereit, wie er z. B. durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Proteinen bereitgestellt, umfassend:

- a) Transformieren eines erfindungsgemäßen auxotrophen Hefestamms mit einer Kombination eines zur Expression geeigneten erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls und einem zur Expression geeigneten heterologen Gen unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors;
- b) Kultivieren der Transformanden unter zur Expression des heterologen Gens und des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls geeigneten Bedingungen und gegebenenfalls Isolieren des Proteins, welches von dem heterologen Gen kodiert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren ferner den Schritt des Selektionierens der Transformanden auf Phenylalanin- und/oder Tyrosin-Mangelmedium.

Das erfindungsgemäße rekombinante Herstellungsverfahren ist durchführbar mit räumlich voneinander getrenntem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül und heterologen Gen, wobei die beiden in zwei Vektoren bereitgestellt werden (binäres Vektor-System) und unabhängig voneinander transformiert werden können. Alternativ liegen das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodiert, und das heterologe Gen in einem Vektor vor. Diese Kointegrat-Vektoren weisen den Vorteil auf, daß das selektierbare Markogen und das heterologe Gen kovalent miteinander verbunden sind, so daß alle nach Transformation prototrophen Klone auch das heterologe Gen enthalten, wodurch der Aufwand des Absuchens (Screenings) reduziert wird.

Erfindungsgemäß bevorzugte Promotoren und Vektoren für die Expression des heterologen Gens entsprechen den für die Expression des erfindungsgemäßen Nukleinsäu-

remoleküs vorstehend angegebenen Promotoren und Vektoren. Der Vektor enthält gegebenenfalls weiterhin eine Signalpeptid-kodierende Nukleinsäuresequenz, die die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Medium bewirkt, und die direkt 5' mit dem heterologen Gen verbunden ist. Weiterhin vorteilhaft ist das Hinzufügen einer His-Tag kodierenden Nukleinsäuresequenz an das 5'-Ende des heterologen Gens, das nach rekombinanter Expression die Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Säule ermöglicht.

Die Erfindung stellt ferner rekombinante Proteine bereit, die durch das vorstehend angegebene Verfahren erhältlich sind.

Es ist beabsichtigt, mit den nachfolgenden Figuren und Beispielen die Erfindung zu erläutern, diese jedoch in keiner Weise einzuschränken. Dem Fachmann sind aufgrund der Beschreibung und der Beispiele weitere Ausführungsformen zugänglich, die ebenfalls umfaßt sind.

Figur 1 zeigt die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren über den Shikimatweg.

Figur 2 zeigt die Ligation der DNA-Fragmente in den Vektor pRS426. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert und in diese Schnittstelle wurden die genomischen Sau3A DNA-Fragmente aus *H. polymorpha* ligiert. Dies ist möglich, da die Schnittstellen BamHI und Sau3A kompatibel sind.

Figur 3 zeigt den Wachstumsvergleich von mit 2 komplementierenden DNA-Fragmenten transformierten Zellen. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten wurde Zellmaterial der mit einem 5kb- (pME1524) oder einem 1,8 kb- (pME1525; Subklon von pME1524) DNA-Fragment komplementierten Zellen in Wasser verdünnt und von jeder Verdünnungsstufe 20  $\mu$ l auf Minimalmedium aufgetragen. Die optische Dichte der verschiedenen Verdünnungsstufen ist jeweils gleich, da jedoch nur die grundsätzlich verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten veranschaulicht werden sollten, wurden keine genauen Wachstumsparameter ermittelt.

Figur 4 zeigt die Autoradiographie einer Hybridisierung chromosomaler DNA aus verschiedenen Pilzen mit einem 1,8 kb DNA-Fragment aus *H. polymorpha*, das zur Komplementation der Phenylalamin-/Tyrosin-Auxotrophie des *S. cerevisiae* aro7Δ-Selektionsstammes fähig ist. Chromosomal DNA von *S. cerevisiae* (1), *A. nidulans* (2) und *H. polymorpha* (3) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten und mit einer <sup>32</sup>P-radioaktiv markierten DNA-Sonde, hergestellt unter Verwendung des genomischen 1,8 kb DNA-Fragmentes aus *H. polymorpha*, hybridisiert.

Figur 5 zeigt die Sequenz eines genomischen 1,8 kb-Fragmentes (SEQ ID NO:3), das zur Komplementation der Phenylalamin-/Tyrosin-Auxotrophie des *S. cerevisiae* aro7Δ-Selektionsstammes fähig ist. Die 5'- und 3'-Region sind in Kleinbuchstaben dargestellt, das offene Leseraster (SEQ ID NO:1) und die Primärsequenz (SEQ ID NO:2) des abgeleiteten Genproduktes in Großbuchstaben.

Figur 6 zeigt die Amplifizierung der flankierenden Regionen des HARO7-ORFs'. Die flankierenden Regionen des HARO7-Gens wurden mit den Primern OLSK34/T7 bzw. OLSK35/T3 amplifiziert und anschließend mit Apal/BgIII bzw. BgIII/XbaI geschnitten. Dies ist möglich, da die Primer OLSK34 und OLSK35 BgIII-Erkennungssequenzen beinhalten.

Figur 7 zeigt die Herstellung verschiedener Deletionskonstrukte. Die flankierenden Regionen des HARO7-ORFs' wurden als Apal/BgIII- bzw. BgIII/XbaI-Fragmente in den Apal/XbaI-geschnittenen Vektor pBluescriptKSII ligiert. Der Vektor pBluescript II KS wird von der Firma STRATAGENE, USA, vertrieben. Der Vektor wurde mit BgIII wieder geöffnet und die mit BamHI bzw. BgIII geschnittenen Disruptionskassetten hineinligiert.

## Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Boehringer Ingelheim Bioproducts (Heidelberg, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland), Gibco BRL (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen wurden von MBI Fermentas (Vilnius, LIT), RNase A bei der Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland) erworben. Als DNA-Größenstandard wurde die '1 kb DNA-Leiter' (Gene Ruler Plus) von MBI Fermentas verwendet. Agarose wurde von Roth bezogen.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* und zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

Synthetische Oligonukleotide wurden bei Nucleic Acid Products Supply Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) und Gibco BRL (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) erworben.

Auftragssequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech-GmbH (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

#### 1.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Für Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  [F', $\varphi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZY A-argF),U169,deoR,recA1,endA1,hsdR17,(r<sub>K</sub><sup>-</sup>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>),supE44, $\lambda$ -,thi-1,gyrA96,relA1] verwendet (Woodcock, 1989). Für diese Arbeit wurde der *H. polymorpha* Stamm RB11 (ura3) verwendet (Weydemann et al., 1995).

Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit benötigten Plasmide und Oligonukleotide sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Stamm	Genotyp	Referenz
RH 2185	<i>MAT<math>\alpha</math> d<math>\alpha</math>ro7::LEU2 suc2-<math>\delta</math>9 ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519</i>	Schnappauf et al., 1997
RH 1405	<i>MAT<math>\alpha</math> suc2-<math>\delta</math>9 ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519</i>	Schnappauf et al., 1997

Tab. 1: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pRS426	5726 bp Shuttle-Vektor, <i>bla URA3</i>	Sikorski and Hieter, 1989
pBluescriptKS II	2961 bp Vektor, <i>bla, lacZ</i> , Multiple Cloning Site (MCS)	Stratagene
pME1513	p426MET25 mit veränderter MCS (Sacl pMET25 XbaI SpeI BamHI SalI SfiI NotI XhoI <sup>T</sup> CYC1 KpnI)	Probst, 1998
pME1524	5 kb Sau3A-Fragm. aus <i>H. p.</i> in BamHI geschnittenen pRS426	
pME1525	1,8 kb [Apal/HindIII]-Fragment aus pME1524 in pRS426 (SmaI);	
pME1526	pBluescript II KS (Apal/HindIII) + 1,8 kb (Apal/HindIII)-Fragment aus pME1524	

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Oligonukleotid	Göße	Sequenz
T3	20-mer	5'-(AATTAACCCTCACTAAAGGG)-3'
T7	22-mer	5'-(GTAATACGACTCACTATAGGGC)-3'
OLSK34	26-mer	5'-(ATATAGATCTACAAAAACTAACACAGG)-3'
OLSK35	28-mer	5'-(ATATAGATCTGATGCGACGCAGAAAAGC)-3'

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide

## 2. Methoden

### 2.1 Kultivierung der Mikroorganismen

#### 2.1.1 *Escherichia coli*

Die Zellen wurden in Luria-Bertani-Medium (LB: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) bei 37°C kultiviert. Für Stämme mit dem Ampicillin-Resistenzmarker wurde dem Medium 50mg/l Ampicillin zugegeben.

#### 2.1.2 *Hansenula polymorpha*

Die Zellen wurden bei 37°C entweder in „yeast extract peptone dextrose Medium“ (YEFD: 2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glukose) oder in „yeast-nitrogen-base-Medium“ (YNB: 0,15% Yeast Nitrogen Base, 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% myo-Inositol (200 mM), 5% Glukose, für den vorliegenden Stamm supplementiert mit Uracil), kultiviert. Alle Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert und für feste Medien wurde 2% Agar hinzugegeben.

#### 2.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Zellen wurden bei 30°C entweder in „yeast extract peptone dextrose Medium“ (YEFD: 2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glukose) oder in „minimal vitamins Medium“ (MV: 0,15% Yeast Nitrogen Base, 0,52% Ammoniumsulfat, 2% Glukose, 1% Succinat, 0,3% KOH) kultiviert. Supplemente wie L-Aminosäuren oder Uracil wurden entsprechend Sherman et al. (1986) zugesetzt und, ebenso wie auch Antibiotika, steril filtriert bzw. autoklaviert und dem sterilen Medium zugegeben. Für feste Medien wurde 2% Agar hinzugegeben. Das Wachstum der Hefezellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

## 2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.2.1 Qiagen Plasmid-DNA Präparation aus *Escherichia coli*

Es wurden zunächst die kultivierten Bakterien abzentrifugiert und das entstandene Sediment wurde in 0,3 ml Puffer P1 (Bezeichnung der Puffer gemäß Hersteller) resuspendiert. Dann wurden 0,3 ml Puffer P2 hinzugegeben und das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 0,3 ml des gekühlten Puffers P3 hinzugefügt und erneut für 5 min, diesmal auf Eis, inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min zentrifugiert (12000 UpM) und der Überstand auf eine zuvor mit Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 20 Säule gegeben. Nachdem der Überstand die Säule durchlaufen hatte, wurde diese viermal mit je 1 ml Puffer QC gewaschen. Die gebundene DNA wurde mit 0,8 ml Puffer QF eluiert. Die eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (30 min, 10000 UpM). Schließlich wurde die DNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* (Birnboim and Doly, 1979)

Die *E. coli*-Kulturen wurden über Nacht in 5 ml LB-Amp bei 37°C auf einem Rotations-schüttler kultiviert. 1,5 ml der Kultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert und die Zellen in 100 µl Lösung I (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 4 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach 7 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Lösung II (0,2 mM NaOH, 1 % w/v SDS) zugegeben, das Gemisch leicht geschüttelt und auf Eis 5 min lang inkubiert. 50 µl Lösung III (3 M Na-Aacetat, pH 4,8) wurden zugegeben, die Mischung erneut leicht geschüttelt und weitere 7 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand mit 450 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-gesättigtem Phenol in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) und anschließend mit 450 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Das Plasmid wurde durch Zugabe von 1 ml kaltem EtOH und Inkubation bei -20°C gefällt. Der Niederschlag wurde nach 30 min Zentrifugation bei 4°C mit 200 µl 70%igem EtOH gewaschen, in vacuo getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (inkl. 25 µg/ml RNase A) aufgenommen. Zum Lösen der DNA wurde für 5 min auf 65 °C erhitzt,

der RNA-Abbau erfolgte mit Hilfe der hitzestabilen RNase A durch Inkubation für 20 min bei 37 °C. Die erhaltene Plasmid-DNA-Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *Hansenula polymorpha***

**(Hoffman and Winston, 1987)**

Es wurden 10 ml YEPD-Medium angeimpft und für etwa 15 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 0,5 ml destilliertem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 0,2 ml Lysis-Puffer (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA), 0,2 ml Phenol/MeCl<sub>2</sub>/ TE und 0,3 g Glaskugeln hinzugegeben. Zum Aufbrechen der Zellen wurde 3-4 min geschüttelt und anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 13000 UpM). Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß gegeben und nach Zugabe von 1 ml Ethanol wurde die DNA gefällt und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und es wurden 3 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben, woraufhin der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert wurde. Nun wurden 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol hinzugefügt, die ausgefallene DNA wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen, getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen.

## **2.3 Klonierungstechniken**

### **2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion ('PCR'; Saiki et al., 1985)**

Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit dem thermostabilen Enzym Taq-Polymerase (Fermentas) in GeneAmpTM-Reaktionsgefäß (Eppendorf) durchgeführt. Üblicherweise wurden jeweils 5-50 nmol Primer-Oligonukleotid und 10-100 ng DNA als Matrize in 20-50 µl Reaktionspuffer entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. In der Regel wurden 30 Zyklen des folgenden Temperaturprofils durchlaufen: 30 s Denaturierung bei 94°C / 30 s Hybridisierung bei spezifischer Anlagerungstemperatur / 30 s-3 min Synthese bei 72°C für Taq-DNA-Polymerase. Die PCR-Zyklen wurden durch einen 3-

minütigen Denaturierungsschritt eingeleitet und durch einen finalen Syntheseschritt von 5 min abgeschlossen.

### **2.3.2 Restriktion von DNA**

Für analytische Restriktionsreaktionen wurden ca. 0,5 µg DNA mit 1-2 Einheiten Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl bei 37°C 2-3 h inkubiert. Für die Restriktion präparativer Mengen an DNA wurden entsprechend größere Volumina und Mengen Enzym eingesetzt. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Zu dem Restriktionsansatz wurden 0,1 Vol. DNA-Dye (25% w/v Ficoll 400, 0,25% w/v Bromphenolblau, 0,25% w/v Xylencyanol, 200 mM EDTA, pH 8,0) gegeben und die DNA-Fragmente in einem horizontalen Agarosegel in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA, pH 8,3) in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch getrennt. DNA-Banden wurden mittels eines UV-Transilluminators (254 nm) detektiert.

### **2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose**

Um DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurden die Säulen und Puffer des QIAquick Gel Extraktion Kit Protocols gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Hierbei wurden zunächst die DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und gewogen. Es wurden 3 Volumen des Puffers QX1 hinzugegeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Sobald sich das Gelfragment vollständig gelöst hatte, wurde 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben und das Gemisch wurde auf die QIAquick-Säule gegeben und abzentrifugiert. Um die an die Säule gebundene DNA zu waschen, wurden 0,75 ml PE-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten (Maniatis et al., 1989)

Lineare DNA-Fragmente mit kohäsiven oder glatten Enden wurden in einem Reaktionsgemisch in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Ligationspuffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,6 mM ATP, pH 7,6) und 5 Einheiten T4-DNA-Ligase über Nacht bei 15°C oder für 5 h bei Raumtemperatur ligiert. Die Konzentration an DNA betrug zwischen 1 und 10 µg/ml, das molare Verhältnis Vektor/Insert-DNA zwischen 1:5 und 1:10. Im Anschluß an die Ligationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation eingesetzt.

## 2.4 Transformationsmethoden

### 2.4.1 Transformation von *E. coli* (Inoue et al., 1990)

Zellen einer 250 ml SOB-Kultur (2% Trypton, 0,5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) wurden in der exponentiellen Phase 10 min bei 4°C abzentrifugiert (1000xg) und in 80 ml TB-Puffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O, 250 mM KCl, pH 6,7, 55 mM MnCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Nach Inkubation (10 min auf Eis) wurden die Zellen nochmal bei 4°C und 2500 UpM abzentrifugiert. Danach wurde das Sediment vorsichtig in 20 ml TB-Puffer resuspendiert und ebenso vorsichtig mit 7% DMSO durchmischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die nun kompetenten Zellen aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Zu 1-10 µg DNA wurden 200 µl kompetente Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 s Hitzeschock bei 42°C wurde der Ansatz auf Eis abgeschreckt, mit 800 µl SOC-Medium (SOB, inkl. 20 mM Glukose) versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Verschiedene Mengen (10 – 900 µl) der Zellkultur wurden auf festem Selektivmedium (Agar-Platten mit LB-Vollmedium, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und schließlich die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert, um transformierten Zellen die Zeit zur Koloniebildung zu geben.

### **2.4.2. *S. cerevisiae*-Transformation (modifiziert nach Ito et al., 1983)**

Je Transformationsansatz wurden 0,5 ml einer frischen, über Nacht gewachsenen Hefekultur verwendet. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (5 min, 3500 UpM) und der Überstand wurde entfernt. Nun wurde die zu transformierende DNA und 50 µg Carrier-DNA hinzugegeben und vermischt. Schließlich wurden 0,5 ml PEG (40 % PEG3350, 0,1 M LiOAc, 10 mM Tris pH7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M DTT) hinzugegeben, und die Transformationsansätze wurden geschüttelt und für mindestens 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 20 minütigen Hitzeschock (42°C) wurden die Zellen vorsichtig anzentrifugiert und in 1 ml YEPD für 1 h bei 30°C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen für 5 s in der Tischzentrifuge anzentrifugiert, nach Verwerfen des Überstandes in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf Selektionsmedien ausplattiert.

## **2.5 Hybridisierungstechniken**

### **2.5.1 Southern-Hybridisierung (Southern, 1975)**

Für die Southern-Hybridisierung wurden ca. 10 µg chromosomaler DNA in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5) gelöst und für 12 h in einem Restriktionsverdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym eingesetzt. Die geschnittene DNA wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Agarosegel wurde dreimal für jeweils 20 min gewaschen, zunächst in 0,25 M HCl, dann in 5 M NaOH/ 1,0 M NaCl und schließlich in 1 M NH<sub>4</sub>OAc. Nun wurde die aufgetrennte DNA durch ein 12stündiges Trockenblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wurde anschließend für 2 min in 2 x SSC (0,1 M NaCl, 10 mM NaOAc, pH 7,0) gewaschen, an der Luft getrocknet, und schließlich wurde unter UV-Licht (254 nm) für 5 min 'cross-linking' durchgeführt.

Die Membran wurde mit 50 ml Church-Puffer (7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 250 mM Na-Phosphat, pH7,2) für 30 min bei 65°C prähybridisiert, wobei anschließend die Hälfte der Hybridisierungslösung verworfen wurde. Nun wurde die radioaktiv markierte DNA-Probe hinzugegeben und die Hybridisierung wurde bei 65°C über Nacht durchgeführt.

Im Anschluß an die Hybridisierung wurde die Membran für 30 min bei 65°C mit 2 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen und dann auf einem Röntgenfilm oder auf einer Phosphor- Imaging-plate exponiert.

### **2.5.2 Herstellung der Sonden-DNA**

Zur Herstellung der Sonden-DNA wurde das Prime-It (Random Primer Labeling Kit) der Firma Stratagene gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Die benötigte DNA wurde zuvor durch PCR amplifiziert und dann für die Sondenherstellung eingesetzt.

## **2.6 Charakterisierung der Chorismatmutase von *Hansenula polymorpha***

### **2.6.1 Rohextrakt-Präparation**

Die Hefezellen wurden in YNB-Medium, für die einzelnen Hefestämme individuell supplementiert, kultiviert und bei einer OD<sub>546</sub> von ca. 4 geerntet. Rohextrakte wurden hergestellt wie bei Kradolfer et al. (1977) beschrieben, unter Verwendung einer Amicon French Press.

### **2.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes**

Der Proteingehalt der Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit BSA als Proteinstandard bestimmt.

### **2.6.3 Messung der Enzymaktivität**

Zur Messung der Chorismatmutaseaktivität wurden Stopptests, wie von Schmidheini et al. (1989) entwickelt, mit einigen Modifikationen durchgeführt. Sämtliche Enzymtests und Messungen der Extinktion wurden bei 30°C durchgeführt. Die Reaktionsansätze von 500 µl enthielten 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6, 2 mM EDTA, 20 mM DTT und 10 µl der jeweiligen Proteinfraktion. Die Reaktion, d.h. die Umwandlung von Chorismat zu Prephenat, wurde durch Zugabe von Chorismat in einer Endkonzentration von 1 mM

gestartet und nach 10 min mit 500  $\mu$ l 1 M HCl gestoppt, welches außerdem die Umsetzung von Prephenat in das bei  $OD_{320}$  meßbare Phenylpyruvat bewirkt. Neutralisierung durch Zusatz von 4 ml 1 M NaOH beendete die Reaktion. Die Messung der  $OD_{320}$  erfolgte gegen  $H_2O$ , als Nullwerte wurden entsprechende Lösungen ohne Enzym verwendet. Die Messungen wurden auch in Gegenwart von 5  $\mu$ M L-Tryptophan durchgeführt. Die Nullwerte der Messungen ohne Enzym wurden von den Absorptionswerten subtrahiert. Mit dem molekularen Extinktionskoeffizienten von Phenylpyruvat bei 30°C von 13095  $\mu$ l/(mol x cm) konnte die Umsatzgeschwindigkeit ( $\mu$ mol Produkt/(min x mg Protein) und damit die spezifische Aktivität (U/mg Protein) berechnet werden.

## Resultate

### 1. Herstellung einer genomischen Genbank von *Hansenula polymorpha*

Zur Herstellung einer genomischen Genbank wurde chromosomal DNA aus *Hansenula polymorpha* RB11 isoliert und diese in einer partiellen Restriktion mit dem Enzym Sau3A eingesetzt. Die Erkennungssequenz dieses Restriktionsenzyms ist relativ häufig im Genom vorhanden, da sie nur aus 4 Basen besteht. Während der 5stündigen Reaktionszeit wurden in Intervallen von 15 min Aliquots entnommen und die Reaktion jeweils durch Zugabe von EDTA gestoppt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß die chromosomal DNA in Fragmente unterschiedlicher Größe zerschnitten wurde. Die geschnittene DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, in verschiedene Größenfraktionen zwischen 1 kb und 10 kb eingeteilt und entsprechend aus dem Gel extrahiert. Die extrahierten Fragmentfraktionen wurden in den zuvor mit BamHI linearisierten Vektor pRS426 (Sikorski and Hieter, 1989) ligiert (Figur 2).

Die so erhaltene Plasmid-Bibliothek wurde in *E. coli* transformiert, wobei in Gegenwart von Ampicillin auf die durch das bla-Gen kodierte Antibiotikaresistenz selektioniert wurde. Insgesamt wurden ungefähr 150 000 Transformanden erhalten. Diese wurden mit LB-Medium von den Platten gewaschen und nach Zugabe von Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

## 2. Ein genomisches 1,8 kb DNA-Fragment aus *H. polymorpha* komplementiert den *aro7Δ*-Phänotyp in *S. cerevisiae*

Die Plasmide der genomischen *H. polymorpha*-Bank wurden aus *E. coli* isoliert und in den *S. cerevisiae*-Stamm RH2185 (*MATα aro7::LEU2 suc2-δ9 ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519*) transformiert, um dessen Tyr/Phe-Auxotrophie zu komplementieren, die auf eine Deletion im *ARO7*-Gen zurückzuführen ist. Die transformierten Hefezellen wurden zunächst auf Uracil-Prototrophie und damit auf das Vorhandensein des *URA3*-Gens des Vektors pRS426 selektiert (SC-Ura) und anschließend auf Minimalmedium (YNB +Trp +His) überführt. Nach ungefähr 5 Inkubationstagen bei 30°C konnten 3 transformierte Hefekolonien isoliert werden, welche in der Lage waren, in Abwesenheit von Uracil, Tyrosin und Phenylalanin zu wachsen. Die Plasmide wurden isoliert und waren auch nach einer Retransformation in der Lage, die *ARO7*-Deletion in RH2185 zu komplementieren. Durch Restriktionsanalyse wurde ein ungefähr 5 kb großes zusätzliches DNA-Fragment in dem Vektor pRS426 identifiziert. Zur weiteren Eingrenzung des DNA-Fragmentes wurde eine Subklonierung durchgeführt, wobei die erhaltenen Fragmente erneut in den Vektor pRS426 ligiert wurden. Diese unterschiedlichen Plasmide wurden nun, analog zu den Plasmiden der genomischen Bank, auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Tyr/Phe-Auxotrophie in RH2185 zu komplementieren. Hierbei wurde ein ungefähr 1,8 kb großes *Apal/Xba*l-Fragment erhalten, welches hierzu in der Lage war. Dieser Befund wurde durch mehrmalige Retransformation bestätigt. Auffällig war, daß das 1,8 kb *H. polymorpha* DNA-Fragment (im Plasmid pME1525) in transformierten Hefezellen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum aufwies, während das 5 kb *H. polymorpha*-Fragment (im Plasmid pME1524) in transformierten Hefezellen zu deutlich langsamerem Wachstum führte (Figur 3).

Um sicherzustellen, daß das komplementierende 1,8 kb-Fragment aus *Hansenula polymorpha* stammte, wurde dieses als Sonde in einer Southern-Hybridisierung eingesetzt. Die chromosomal DNA von *H. polymorpha*, *A. nidulans* und *S. cerevisiae* wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten und nach der Hybridisierung mit der Sonde konnte ein deutliches Signal bei *H. polymorpha*, ein schwaches Signal bei *S. cerevisiae* und kein Signal bei *A. nidulans* festgestellt werden. Des Weiteren konnte durch die

Southern Hybridisierung gezeigt werden, daß das Gen nur einmal im Genom von *H. polymorpha* vorkommt (Figur 4).

Das 1,8 kb DNA-Fragment aus *H. polymorpha* RB11 wurde vollständig sequenziert und es konnte ein aus 843 bp bestehendes offenes Leseraster identifiziert werden (Figur 5), welches eine Übereinstimmung von 58% mit dem ARO7-Gen aus *S. cerevisiae* aufwies. Es kann also davon ausgegangen werden, daß es sich um das zu ARO7 homologe Gen der Hefe *Hansenula polymorpha* handelt, welches im folgenden als HARO7 bezeichnet wird.

### 3. Herstellung verschiedener Deletionskonstrukte

Anhand der Sequenz des 1,8 kb DNA-Fragments aus *H. polymorpha* wurden die Primer OLSK34 und OLSK35 zur Herstellung verschiedener *haro7Δ*-Deletionskonstrukte verwendet. Die verschiedenen Deletionskonstrukte wurden in *H. polymorpha* transformiert, um die Identität des Gens zu belegen und um sicherzustellen, daß in *H. polymorpha* keine Isoenzyme der Chorismatmutase existieren.

Durch eine Deletion von HARO7 in *Hansenula polymorpha* kann die Identität dieses Gens endgültig bewiesen und die Existenz alternativer Gene überprüft werden. Zugleich eröffnet die Konstruktion einer solchen Deletionsmutante neue Selektionsmöglichkeiten. Zur Herstellung eines *haro7Δ*-Deletionsstammes wurden drei unterschiedliche Disruptionskassetten konstruiert. Für die erforderliche Integration in das *Hansenula polymorpha* Genom wurden für alle drei Konstrukte die flankierenden Bereiche des HARO7-Gens verwendet, welche durch homologe Rekombination die Deletion des HARO7-Gens bewirken sollen. Der flankierende Bereich in 3'-Richtung wurde unter Verwendung der Primer OLSK34 und T7 amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsenzymen Apal und BgIII geschnitten. Der flankierende Bereich in 5'-Richtung wurde mit den Primern OLSK35 und T3 amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen XbaI und BgIII geschnitten. Dies ist möglich, da die Primer OLSK34 und OLSK35 eine BgIII-Schnittstelle beinhalten (Figur 6).

Beide Fragmente wurden in den Apal/XbaI geschnittenen Vektor pBluescript KSII ligiert und anschließend wurde der Vektor mit BgIII wieder geöffnet, um verschiedene Disruptionskassetten einzufügen (Figur 7).

Die hisG::URA3::hisG-Disruptionskassette (Schneider et al., 1996) wurde mit BgIII geschnitten und in den oben beschriebenen Vektor ligiert. Anhand des URA3-Markers lässt sich eine Integration der Kassette in das Genom von *H. polymorpha* überprüfen. Ob tatsächlich eine homologe Integration, also eine Deletion von HAR07, stattgefunden hat, kann durch Selektion hinsichtlich einer Phenylalanin/Tyrosin-Auxotrophie und durch Southern Hybridisierung gezeigt werden. Die hisG-Elemente begünstigen die abschließende Excision des URA3-Markers, was durch Gegenselektion mit 5-FOA (5-Fluor-Orot-Säure) überprüft werden kann, da das URA3-Genprodukt eine toxische Umsetzung von 5-FOA bewirkt, so daß lediglich Zellen ohne den URA3-Marker in der Lage sind zu überleben (Boeke et al., 1984).

Die loxP::kanMX::loxP-Disruptionskassette (Güldener et al., 1996) wurde mit BamHI geschnitten und in den oben beschriebenen Vektor ligiert. Anhand des kanMX-Markers lässt sich eine Integration der Kassette in das Genom von *Hansenula polymorpha* durch Selektion hinsichtlich einer Kanamycinresistenz (G418) überprüfen. Das kan<sup>r</sup>-Gen ist flankiert vom Translationelongationsfaktor (TEF)-Promotor und -Terminator (Steiner and Philippse, 1994) des filamentösen Pilzes *Ashbya gossypii*. Ob tatsächlich eine homologe Integration stattgefunden hat, kann durch Selektion auf Phenylalanin/Tyrosin-Auxotrophie und durch Southern Hybridisierung gezeigt werden. Bei diesem System besteht die Möglichkeit, den Marker nach erfolgter Deletion wieder aus dem Genom zu entfernen. Dies geschieht durch das Cre-loxP-Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 (Austin et al., 1981). Das Plasmid pSH47 (Güldener et al., 1996) enthält das Cre-Rekombinase-Gen mit einem vorgeschalteten GAL1-Promotor und desweiteren die Elemente ARS, CEN und einen URA3-Marker. Galaktose induziert die Expression der Rekombinase und diese bewirkt die Entfernung des Markers aus dem Genom durch Rekombination der flankierenden loxP-Regionen.

Die *loxP::ODC1::loxP*-Disruptionskassette ist analog zur *loxP::kanMX::loxP*-Disruptionskassette (Güldener et al., 1996), außer daß das *kanMX*-Gen durch das *ODC1*-Gen (=*URA3*) aus *Hansenula polymorpha* ersetzt wurde (M. Hiller, persönliche Mitteilung). Auch in diesem Fall besteht die Möglichkeit, den Marker nach erfolgter Deletion wieder aus dem Genom zu entfernen. Die Entfernung des Markers kann in diesem Fall durch Selektion auf 5-Fluor-Orot-Säure (5-FOA)-Medium überprüft werden, da das *ODC1*-Genprodukt eine toxische Umsetzung von 5-FOA bewirkt, so daß lediglich Zellen ohne den *ODC1*-Marker in der Lage sind, zu überleben (Boeke et al., 1984).

Die Transformation der *hisG::URA3::hisG*-Disruptionskassette in *H. polymorpha* RB11 führte zu einer Mutante, die eine Tyrosin/Phenylalanin-Auxotrophie und eine Uracil-Prototrophie aufwies, also den zu erwartenden Phänotyp besaß.

#### **4. Beispiel für die rekombinante Expression von Proteinen unter Verwendung auxotropher Hefestämme und der funktionellen Komplementation zur Plasmidselektionierung:**

Zur Expression eines rekombinanten Proteins in *H. polymorpha* unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls können entsprechende Expressionsplasmide hergestellt werden. als Grundlage dient dabei z. B. das Plasmid pMOX (Weydemann et al., 1995). Dieses trägt das *URA3*-Gen aus *S. cerevisiae* zur Selektion in *H. polymorpha* nach Transformation Uracil-auxotropher Stämme wie z. B. RB11 (Weydemann et al., 1995) (*odc1* bzw. *ura3*). Als Expressionsmodul dient der MOX-Promotor (EP-B-O 299 108) aus *H. polymorpha*, gefolgt von der MOX-Terminatorsequenz (Gödecke et al., 1994)

Aus pMOX kann nach Verdauung mit dem Restriktionsenzym *NdeI* ein 5 kb großes DNA-Fragment isoliert werden. Dieses entspricht dem Plasmid ohne die *URA3*-kodierende Sequenz. Nach Auffüllen der Überhänge dieses DNA-Fragmentes durch Klenow-Behandlung kann dieses mit einem 1,3 kb *Eco72I/SspI*-Fragment aus pSK69 (SEQ ID NO:3) ligiert werden. Das resultierende Plasmid trägt nun als selektionierbares Markergen das Chorismatmutase-Gen aus *H. polymorpha*, das für das Enzym Choris-

matmutase kodiert. Die Selektion erfolgt auf Prototrophie bezüglich Tyrosin und Phenylalanin.

Alternativ kann in das mit *Sma*I linearisierte Plasmid pMOXdas 1,3 kb *Eco*72I/*Ssp*I-Fragment einkloniert werden. Dieses Vorgehen führt zu einem Expressionsplasmid, das zwei Markergene trägt, *URA3* und *HAR07*.

In diese Plasmide kann nun in eine geeignete Restriktionsschnittstelle unmittelbar hinter dem *MOX*-Promotorbereich ein rekombinantes DNA-Fragment zur Expression eines heterologen Proteins einkloniert werden. Die kodierende DNA-Sequenz wird dabei vorzugsweise mit einer DNA-Sequenz fusioniert, die die Sekretion und Prozessierung des Expressionsproduktes in *H. polymorpha* garantiert. Als Beispiel einer derartigen Führungssequenz sei die des *MFα1*-Gens aus *S. cerevisiae* (Arnold et al., 1998) genannt.

Zur heterologen Expression wird ein Phe/Tyr-auxotropher *H. polymorpha* Stamm, erzeugt durch Disruption des endogenen Chorismatmutase-Gens, mit einem der oben dargestellten Expressionsplasmide transformiert und positive Transformanden durch Wachstum auf Minimalmedium selektiert. Durch abwechselndes Wachstum in Minimalmedium und Vollmedium können nach einer Vielzahl von Generationen aus diesen solche identifiziert werden, in denen das Expressionskonstrukt mitotisch stabil in das Genom integriert wurde. Als Expressionsstamm wird dann vorzugsweise derjenige verwendet, in dem das Expressionsmodul in höchster Kopienzahl innerhalb des Wirtsgenoms vorliegt. Die Expression des heterologen Proteins erfolgt bevorzugt nach Anzucht des Stammes in Glukose-haltigem Medium durch Wechsel zu Medium mit Glycerin als einziger C-Quelle. Unter diesen Bedingungen liegt Derepression des *FMD*-Promotors vor, verbunden mit der starken Expression des heterologen Proteins. Dieses kann schließlich aus dem gereinigten Kulturüberstand durch chromatographische Standardmethoden in reiner Form isoliert werden.

## 5. Das 1,8 kb-Fragment aus *Hansenula polymorpha* kodiert für ein Protein mit Chorismatmutase-Aktivität

Um zu überprüfen, ob das 1,8 kb Fragment ein Gen enthält, das für ein Protein mit Chorismatmutaseaktivität kodiert, wurden mittels einer French-Press Zellextrakte verschiedener Plasmid-tragender Hefestämme hergestellt und die Chorismatmutaseaktivitäten gemessen. Für die Messung der spezifischen Enzymaktivität wurden Zellextrakte von *S. cerevisiae* RH2185(pRS426), *H. polymorpha* RB11, *S. cerevisiae* RH2185(pME1524) und *S. cerevisiae* RH2185(pME1525) hergestellt. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl das 5 kb-Fragment (pME1524), als auch das 1,8 kb-Fragment (pME1525) aus *H. polymorpha* für Gene für eine Chorismatmutase-Aktivität kodieren (Tab. 4).

Spezifische Aktivität (U/mg) (- Tryptophan)		Spezifische Aktivität (U/mg) (+ Tryptophan)	
<i>S. cerevisiae</i> - RH2185 + pRS426	0	<i>S. cerevisiae</i> - RH2185 + pRS426	0
<i>H. polymorpha</i> RB11	0,379	<i>H. polymorpha</i> RB11	0,349
<i>S. cerevisiae</i> - RH2185 + pME1524	0,191	<i>S. cerevisiae</i> - RH2185 + pME1524	0,127
<i>S. cerevisiae</i> - RH2185 + pME1525	0,469	<i>S. cerevisiae</i> - RH2185 + pME1525	0,263

**Tab. 4: Spezifische Chorismatmutase-Aktivitäten (U/mg Protein) verschiedener Zellextrakte.** In der Tabelle sind jeweils die Mittelwert aus 4 Aktivitätsmessungen aufgeführt. Es wurden die Werte der Zellextrakte von *S. cerevisiae* RH2185+pRS426, *S. c.+pME1524*, *S. c.+pME1525* und *H. polymorpha* RB11 gemessen. Die Messungen wurden jeweils ohne und mit 500 µM Tryptophan durchgeführt.

## 6. Identifizierung des HAR07-Gens der Hefe *Hansenula polymorpha*

Das komplementierende 1,8 kb DNA-Fragment wurde vollständig unter Verwendung eines T3- und eines T7- Primers sequenziert (Figur 5).

Das Enzym Chorismatmutase wird in der Hefe *Hansenula polymorpha* durch ein Gen kodiert, das aus 843 bp besteht und den Namen *HARO7* erhalten hat. Dieses Gen wurde kloniert, indem die Phenylalanin/Tyrosin-Auxotrophie eines *Saccharomyces cerevisiae* *aro7Δ*-Deletionsstammes durch eine genomische Genbank von *Hansenula polymorpha* komplementiert wurde. Der *H. polymorpha*-Promotor ist also in *S. cerevisiae* funktionell. Es sind keine Introns vorhanden, und aus der Sequenz lässt sich ein aus 280 Aminosäuren bestehendes 32 kDa-Protein ableiten. Die Aminosäuresequenz der Chorismatmutase aus *Hansenula polymorpha* weist 58 % Identität zu der aus *Saccharomyces cerevisiae* und 44 % zu der aus *Aspergillus nidulans* auf. Auffällig im Vergleich dieser Aminosäuresequenzen ist ein aus 23 Aminosäuren bestehendes Endstück in der Sequenz von *H. polymorpha*, das weder bei *S. cerevisiae* oder *A. nidulans*, noch bei anderen eukaryontischen Chorismatmutase-Aminosäuresequenzen vorhanden ist.

## Literaturverzeichnis

Agaphonov, M. O., Poznyakovski, A. I., Bogdanova, A. I., and Ter-Avanesyan, M. D. (1994) Isolation and characterization of the LEU2 gene of *Hansenula polymorpha*. Yeast 10; 509-513.

Arnold, C. E., Parekh, R. N., Yang, W. and Wittrup, K. D. (1998) Leader peptide efficiency correlates with signal recognition particle dependence in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 59, 286-293.

Austin, S., Ziese, M., and Sternberg, N. (1981) A novel role for site-Specific recombination in maintenance of bacterial replicons. Cell 25, 729-736.

Birnboim H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

Boeke, J. D., Lacroute, F., and Fink, G. R. (1984) A positive selection of mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol. Gen. Genet. 197, 345-346.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braus, G. H. (1991) Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Model system for the regulation of an eucaryotic biosynthetic pathway. Microbiol. Rev. 55, 349-370.

Buckholtz, R. G. and Gleeson, M. A. G. (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. Biotechnology 9, 1067-1072.

Dobson, M. J., Tuite, M. F., Roberts, N. A., Kingsman, A. J., Kingsman, S. M., Perkins, R. E., Conroy, S. C., and Fothergill, L. A. (1982) Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 10, 2625-2637. ✓

Dohmen, R. J., Strasser, A. W. M., Dahlems, U., and Hollenberg, C. P. (1990) Cloning of the *Schwanniomyces occidentales* glucoamylase gene (GAM1) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 95, 111-121. ✓

Gellissen, G., Hollenberg, C. P., and Janowicz, Z. A. (1994) Gene expression in methylo-trophic yeasts. In: Smith, A. (ed.) *Gene expression in recombinant microorganisms*. Marcel Dekker, New York, 195-239. ✓

Gellissen, G. and Hollenberg, C. P. (1997) Applications of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene* 190, 87-97. ✓

Gilbert, S. C., Van Urk, H., Greenfield, D. M., McAvoy, M. J., Denton, K. A., Coghlan, D., Jones, G. D., and Mead, D. J. (1994) Increase in copy number of an integrated vector during continuous culture of *Hansenula polymorpha* expressing functional human haemoglobin. *Yeast* 10, 1569-1580. ✓

Gödecke, S., Eckart, M., Janowicz, Z. A., and Hollenberg, C. P. (1994) Identification of sequences responsible for transcriptional regulation of the strongly expressed methanol oxidase-encoding gene in *Hansenula polymorpha*. *Gene* 139, 35-42. ✓

Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* 24, 2519-2524. ✓

Hansen, H. and Hollenberg, C. P. (1996) History of *Hansenula polymorpha* Research. In: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook*. Klaus Wolf (ed.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. ✓

Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Ito, H., Jukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alcali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

Janowicz, Z. A., Eckart, M. R., Drewke, C., Roggenkamp, R. O., and Hollenberg, C. P. (1985) Cloning and characterization of the DAS gene encoding the major methanol assimilatory enzyme from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Nucl. Acids Res.* 13, 3043-3062.

Jensen, R. A. and Stenmark, S. L. ((1975) The ancient origin of a second microbial pathway for L-tyrosine biosynthesis in prokaryotes. *J. Mol. Evol.* 4, 249-259.

Kradolfer, P., Zeyer, J., Miozzari, G., and Hütter, R. (1977) Dominant regulatory mutants in chorismate mutase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2, 211-216.

Ledeboer, A. M., Edens, L., Maat, J., Visser, C., Bos, J. W., Verrips, C. T., Janowicz, Z. A., Eckart, M., Roggenkamp, R., and Hollenberg, C. P. (1985) Molecular cloning and characterization of a gene coding for methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*. *Nucl. Acids Res.* 13, 3063-3082.

Lepetic, A., Seigelchifer, M., Arduino, R. C., Lazovski, J., Nacinovich, F., Sturba, E., and Stamboulian, D. (1996) Novel recombinant HB vaccine produced by a high-level expression *Hansenula polymorpha* yeast system. *Clin. Infect. Dis.* 23, 276. *n.e.*

Lodder, J. (1970) The yeast, a taxonomic study. North-Holland Publishing, Amsterdam.

Lorenz, J. H. and Nester, E. W. (1967) Multiple molecular forms of chorismate mutase in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 6, 1541-1552.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual. Book 1. 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

→ Biol 1-3 4-5. Henze

Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P., and Dalbøe, H. (1998) Comparison of Expression Systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Klyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 14, 1267-1283.

Rave, N., Crkvenjaker, R., and Bödtker, H. (1979) Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucl. Acids Res.* 6, 3559-3567.

Saiki, R. K., Schaffr, S., Falloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. E., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of (-globin genomic structures and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Schmidheini, T., Sperisen, P., Paravicini, G., Hütter, R., and Braus, G. H. (1989) A single point mutation results in a constitutively activated and feedback-resistant chorismate mutase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 1124-1153.

Schneider, B. L., Steiner, B., Seufert, W., and Futcher, A. B. (1996) pMPY-ZAP: A reusable Polymerase Chain Reaction-directed gene disruption cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 129-134.

Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) Laboratory Course Manual for METHODS IN YEAST GENETICS. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Steiner, S. and Philippsen, P. (1994) Sequence and promoter analysis of the highly expressed *TEF* gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Gen. Genet.* 242, 263-271.

Van der Klei, I. J., Harder, W., and Veenhuis, M. (1991) Methanol metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Arch. Microbiol.* 156, 15-23.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., and Van Dijken, J. P. (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8, 501-517.

Weidemann, W., Gromoll, J., and Keller, R. (1989) Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS Lett.* 257, 31-34.

Weydemann, U., Keup, P., Piontek, M., Strasser, A. W. M., Schweden, J., Gellissen, G., and Janowicz, Z. A. (1995) High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* – authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 377-385.

Woodcock, D. M. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* 17, 3469-3478.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rhein Biotech Gesellschaft für neue biotechnologische Prozesse und Produkte mbH

<120> Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodierende Nukleinsäure

<130> P30558-01996

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 843

<212> DNA

<213> Hansenula polymorpha

<400> 1

atggacttta tgaagccaga aacagtgcgt gaccctggca acattagaga tgccttggtc 60  
 cgatggagg atacgatcat cttcaacttt atcgagcggt cgcaattcta tgcgtcgccc 120  
 tcggtatata aagtcaacca gttccctatt cccaaacttcg acggctcggt cttggactgg 180  
 ctgttgcgcg agcacgagcg aatccattcg caggtgagga gatacgacgc gccagacgag 240  
 gtgcctttt tcccccaacgt gctggaaaaa acgtttctgc ccaagatcaa ctaccatcg 300  
 gtgcttagcct cctacgcgga tgaatcaac gtcaacaaag agataactcaa gatctacacg 360  
 tcagagatag taccaggaat agctgcaggc agcggagagc aggaggacaa cttggctcg 420  
 tgcgcataatgg ccgacatcgat gtcgtcgag tgcgtatcca gaagaatcca ttttggccgt 480  
 tttgtcgcag aggctaaatt tattcgtgag ggggacaaga ttgtggatct gatcaaaaag 540  
 agagatgtgg aaggcattga ggcgctcatc acaaacgcgg aggtcgaaaa acggatctt 600  
 gacagacttc tggagaaggg aaggcgat ggaacagacg cgacactaaa gttcacgcag 660  
 cacattcaga gcaaggtgaa gcccggaggtg attgtgaaaa tctacaagga tttcgtgatt 720  
 ccgctcacga agaaggtcga agtcgactac ttgctgagac ggctggagga cgaggaggac 780  
 gatgtatgcga cgacaaaaag cggcggctac gttgaccgggt ttctctccctc tggcttgatc 840  
 tag 843

<210> 2

<211> 280

<212> PRT

<213> Hansenula polymorpha

<400> 2

Met Asp Phe Met Lys Pro Glu Thr Val Leu Asp Leu Gly Asn Ile Arg  
 1 5 10 15

Asp Ala Leu Val Arg Met Glu Asp Thr Ile Ile Phe Asn Phe Ile Glu  
 20 25 30

Arg Ser Gln Phe Tyr Ala Ser Pro Ser Val Tyr Lys Val Asn Gln Phe  
 35 40 45

Pro Ile Pro Asn Phe Asp Gly Ser Phe Leu Asp Trp Leu Leu Ser Gln  
 50 55 60

His Glu Arg Ile His Ser Gln Val Arg Arg Tyr Asp Ala Pro Asp Glu  
 65 70 75 80

47

Val Pro Phe Phe Pro Asn Val Leu Glu Lys Thr Phe Leu Pro Lys Ile  
 85. 90 95

Asn Tyr Pro Ser Val Leu Ala Ser Tyr Ala Asp Glu Ile Asn Val Asn  
 100 105 110

Lys Glu Ile Leu Lys Ile Tyr Thr Ser Glu Ile Val Pro Gly Ile Ala  
 115 120 125

Ala Gly Ser Gly Glu Gln Glu Asp Asn Leu Gly Ser Cys Ala Met Ala  
 130 135 140

Asp Ile Glu Cys Leu Gln Ser Leu Ser Arg Arg Ile His Phe Gly Arg  
 145 150 155 160

Phe Val Ala Glu Ala Lys Phe Ile Ser Glu Gly Asp Lys Ile Val Asp  
 165 170 175

Leu Ile Lys Lys Arg Asp Val Glu Gly Ile Glu Ala Leu Ile Thr Asn  
 180 185 190

Ala Glu Val Glu Lys Arg Ile Leu Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Arg  
 195 200 205

Ala Tyr Gly Thr Asp Pro Thr Leu Lys Phe Thr Gln His Ile Gln Ser  
 210 215 220

Lys Val Lys Pro Glu Val Ile Val Lys Ile Tyr Lys Asp Phe Val Ile  
 225 230 235 240

Pro Leu Thr Lys Lys Val Glu Val Asp Tyr Leu Leu Arg Arg Leu Glu  
 245 250 255

Asp Glu Glu Asp Asp Asp Ala Thr Gln Lys Ser Gly Gly Tyr Val Asp  
 260 265 270

Arg Phe Leu Ser Ser Gly Leu Tyr  
 275 280

<210> 3  
 <211> 1655  
 <212> DNA  
 <213> Hansenula polymorpha

<220>  
 <221> gene  
 <222> (1) .. (1655)  
 <223> 1,8 kb genomisches DNA-Fragment aus Hansenula  
 polymorpha

<400> 3  
 cccggcccaa tgccagcaat atggagacgt ttaggcagaa taggcgttcc atacttctca 60  
 cgctgttgt tgccacccgga atatacaccg cattgcagtt tgcacacatc atacttatgt 120  
 acgattacat tggccggaaacg tatcgcgagt cgctcacgag acgcattaga atgacagaga 180  
 aatcgcgaaa cgaccttata gacgcacgtg aaaactacgg gtttggaggc agcaaggagg 240  
 agcgaatcca gcgggttttg tggttcagac atctttcggt gcttttaggc gaggataagc 300  
 gaacttgagg agcgtttttt ttttcctgtt tagttttgtt aggtatggac ttttatgaagc 360  
 cagaaaacagt gctggacctt ggcaacatta gagatgcctt ggtccggatg gaggataacga 420  
 tcatcttcaa ctttatcgag cggtcgcagt tctatgcgtc gcccctcggtt tacaaaagtca 480

accaggttccc	tattcccaiac	ttcgacggct	cgttcttgg	ctggctgttg	tcgcagca	540
agcgaatcca	ttcgcagg	tg aggagatacg	acgcggcc	cgagggtgc	ctt	600
acgtgctgga	aaaaacgtt	ctgccc	tcaactaccc	atcggtg	ctac	660
cgatgaaat	caacgtcaac	aaagagatac	tcaagatcta	cacgtc	agag	720
gaatagctgc	aggcagcgg	gagcaggagg	acaac	ctcgtgc	ca	780
tcgagtgct	gcagtcg	tccagaagaa	tccat	ccgtt	gtc	840
aatttatcg	tgagggggac	aagattgtgg	atctgat	aaagagagat	gtgg	900
ttgaggcgct	catcacaaac	gcccagg	aaaaacggat	cttgg	acaga	960
agggaaaggc	gtatgg	gac	taaagg	tcac	gcag	1020
tgaagccg	gtgt	aaaatctaca	aggat	ttcg	tcatt	1080
tcgaagt	ctacttgc	agacgg	aggac	gagga	ggac	1140
aaagcgg	ctacgtt	cggtt	cctctgg	gtact	atgaaa	1200
cagtactt	ta	attct	catacc	atgg	taat	1260
aaaagtgg	gcgttgg	ggcag	cagaat	atgc	aaagg	1320
cccccagg	ccgct	tccaa	cctaata	tcac	ggcc	1380
cagcttctt	tagttgt	tctg	ggactt	gatc	actt	1440
gaaccacatc	ccgtaac	ccagc	aaagac	gcag	atgt	1500
cttcctggca	atattcc	actcgat	gtttt	cacg	tcgt	1560
atacgtccg	ctacccaaac	tttcttgc	cagcgt	taggt	ccc	1620
cttgatgc	cccg	tatgtgt	acag	tttctt	gatcc	1655

### Patentansprüche

1. Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodierende Nukleinsäure oder deren Gegenstrang, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus
- (a) einer Nukleinsäure mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen DNA-Sequenz bzw. der ihr entsprechenden RNA-Sequenz;
  - (b) einer Nukleinsäure, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäure nach (a) hybridisiert;
  - (c) einer Nukleinsäure, die aufgrund des genetischen Codes zu den in (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert ist;
  - (d) einer Nukleinsäure, die mit einer der in (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuren hybridisiert und deren Gegenstrang für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodiert;
  - (e) eine Nukleinsäure, die wenigstens 60 % homolog zu einer der in (a) bis (d) angegebenen Nukleinsäuren ist;
  - (f) einer Variante der in (a) bis (e) angegebenen Nukleinsäuren, wobei die Variante gegenüber den in (a) bis (e) angegebenen Nukleinsäuren Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweist;
  - (g) einem Fragment einer der in (a) bis (f) angegebenen Nukleinsäuren;
  - (h) einer Kombination mehrerer der in (a) bis (g) angegebenen Nukleinsäuren,

wobei das von der Nukleinsäure oder deren Gegenstrang kodierte Polypeptid wenigstens 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweist.

2. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Desoxyribonukleinsäure-Molekül ist.

3. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die unter (b) oder (d) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird.

4. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die unter (e) angegebene Nukleinsäure wenigstens 80 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuren ist.

5. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die unter (e) angegebene Nukleinsäure wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuren ist.

6. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die unter (e) angegebene Nukleinsäure wenigstens 95 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuren ist.

7. Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das von der Nukleinsäure kodierte Polypeptid wenigstens 50 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweist.

8. Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das von der Nukleinsäure kodierte Polypeptid wenigstens 75 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweist.

9. Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität kodierende Nukleinsäure unter der Kontrolle des Promotors steht.
10. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Promotor der MOX-Promotor oder der FMD-Promotor aus *Hansenula polymorpha* ist.
11. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 9 oder 10, weiterhin umfassend eine zur Expression und gegebenenfalls Sekretion geeignete heterologe Nukleinsäuresequenz.
12. Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei das Nukleinsäuremolekül wenigstens einen Teil eines Vektors enthält, wobei der Vektor ausgewählt ist aus: Bakteriophagen, Plasmiden, Adenoviren, Vaccinia-viren, Baculoviren, SV40-Virus und Retroviren.
13. Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei das Nukleinsäure-Molekül weiterhin eine His-Tag-kodierende Nukleinsäuresequenz umfaßt und die Expression des Nukleinsäure-Moleküles zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag führt.
14. Wirtszelle, enthaltend ein Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Nukleinsäure-Moleküls geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.
15. Wirtszelle gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die prokaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus *E. coli* und *Bacillus subtilis*.
16. Wirtszelle gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die eukaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus Hefezellen wie *Hansenula polymorpha* und *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzellen und Säugerzellen, bevorzugt aus CHO-Zellen, COS-Zellen und HeLa-Zellen.

17. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptides mit Chorismatmutase-Aktivität, wobei das Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird und das Protein gegebenenfalls isoliert wird.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hergestellte Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität natürlich oder chemisch modifiziert wird.

19. Verfahren gemäß Anspruch 17 oder 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Expression in einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16 durchgeführt wird.

20. Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität, umfassend eine Aminosäuresequenz, die von einem oder mehreren der Nukleinsäure-Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 12 kodiert wird.

21. Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität gemäß Anspruch 20, umfassend die in SEQ ID NO:2 angegebene Aminosäuresequenz oder ein Fragment davon, das wenigstens 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweist.

22. Rekombinantes Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19 oder Modifikationen davon.

23. Antikörper, erhältlich durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem rekombinanten Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

24. Verfahren zur Herstellung eines Phenylalanin- und Tyrosin-auxotrophen Hefestamms, umfassend das Zerstören des endogenen Chorismatmutase-Gens des entsprechenden Hefestamms, wobei die Mutante weniger als 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID No: 2 aufweist.

25. Verfahren gemäß Anspruch 24, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellen eines Konstruktes, umfassend wenigstens zwei Fragmente einer zur homologen Rekombination geeigneten Nukleinsäure gemäß Anspruch 1(a) bis (h); die eine zur homologen Rekombination nicht geeignete Nukleinsäure flankieren;
- b) Transformieren von Zellen eines Hefestamms mit intaktem endogenen Chorismat-mutase-Gen mit diesem Konstrukt und
- c) Identifizieren von Phenylalanin- und Tyrosin- auxotrophen Transformanden.

26. Verfahren gemäß Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren weiterhin das Selektionieren der Transformanden auf Phenylalanin/Tyrosin-Mangelmedium umfaßt.

27. Verfahren gemäß Anspruch 25 oder 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Konstrukt ferner ein Selektionsmarkergen umfaßt.

28. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 25 bis 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Konstrukt weiterhin eine oder mehrere Rekombinationsstellen umfaßt.

29. Verfahren gemäß Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Rekombinationsstelle loxP ist.

30. Verfahren gemäß Anspruch 29, **dadurch gekennzeichnet** daß die Zellen des Hefestamms in Schritt b) ferner mit zur Expression von Cre-Rekombinase geeigneter Nukleinsäure in Kontakt gebracht werden.

31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 bis 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Hefestamm *Hansenula polymorpha* ist.

32. Phenylalanin- und Tyrosin- auxotropher Hefestamm, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 bis 31.

33. Auxotropher Hefestamm gemäß Anspruch 32, **dadurch gekennzeichnet** daß er eine Mutante eines prototrophen Hefestammes von *Hansenula polymorpha* ist.

34. Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Proteinen, umfassend:

a) Transformieren des auxotrophen Hefestammes gemäß Anspruch 32 oder 33 mit einer Kombination von einem zur Expression geeigneten Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13 und einem zur Expression geeigneten heterologen Gen unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors; und

b) Kultivieren der Transformanden unter zur Expression des heterologen Gens und des Nukleinsäure-Moleküls geeigneten Bedingungen und gegebenenfalls Isolieren des Proteins, welches von dem heterologen Gen kodiert wird.

35. Verfahren gemäß Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren ferner den Schritt des Selektionierens der Transformanden auf Phenylalanin- und/oder Tyrosin-Mangelmedium umfaßt.

36. Verfahren gemäß Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-Molekül und das heterologe Gen voneinander getrennt sind.

37. Verfahren gemäß Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-Molekül und das heterologe Gen und in einem Vektor vorliegen.

38. Rekombinantes Protein, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 37.

Fig. 1

55

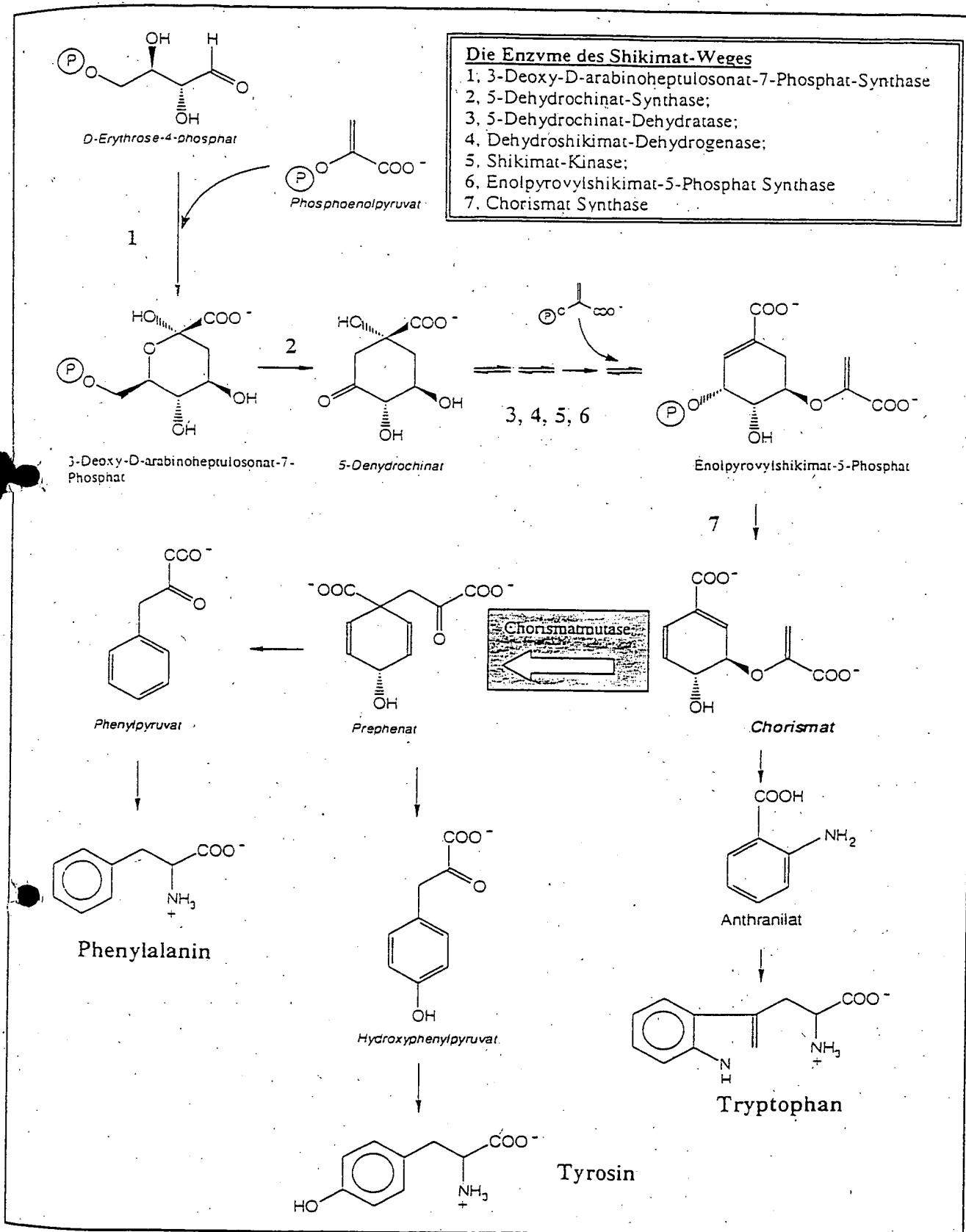


Fig. 2

56

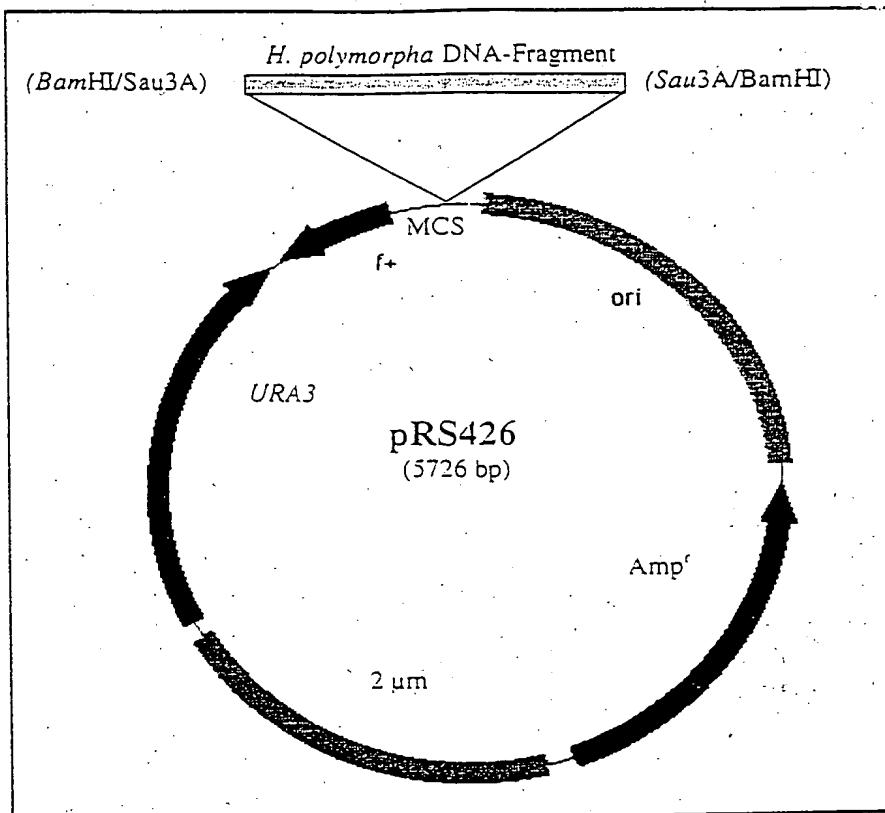


Fig. 3

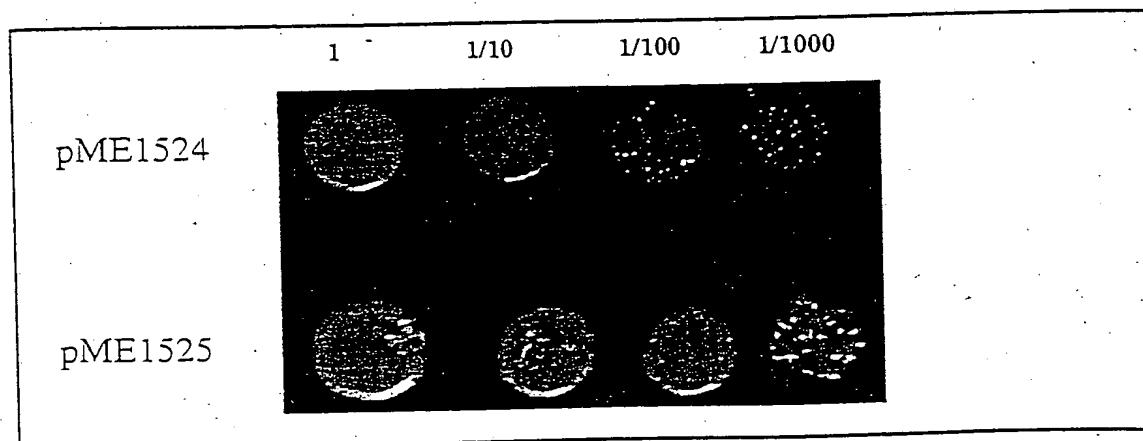
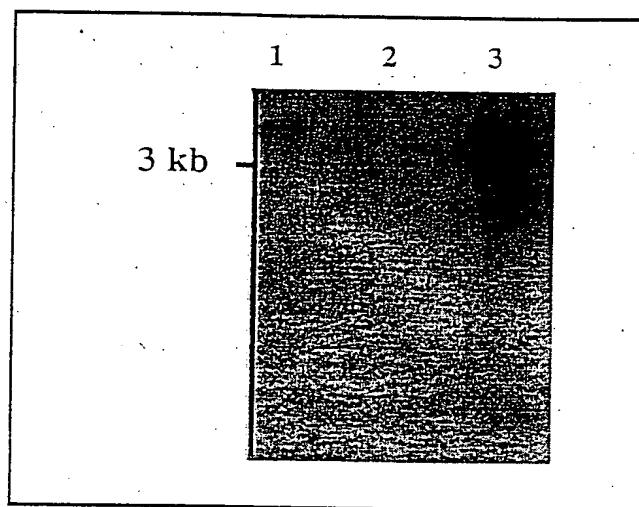


Fig. 4



## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Polypeptid mit Chorismatmutase-Aktivität und Derivate davon kodierende Nukleinsäure, wobei die Derivate wenigstens 10 % der Chorismatmutase-Aktivität der Chorismatmutase gemäß SEQ ID NO:2 aufweisen. Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuremoleküle enthaltende Vektoren, Nukleinsäuremoleküle umfassende Wirtszellen und deren Verwendung in Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden mit Chorismatmutase-Aktivität.

Die Erfindung betrifft ferner die Polypeptide mit Chorismatmutase-Aktivität und Antikörper, die diese spezifisch erkennen.

Die Erfindung betrifft außerdem Verfahren zur Herstellung von auxotrophen Hefestämmen mit Hilfe der Nukleinsäuremoleküle und die Bereitstellung der Hefestämme. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Hefestämme zusammen mit den erfindungsgemäßen Vektoren in Verfahren zur rekombinanten Expression heterologer Gene, die die leichte Selektierbarkeit der Transformanden durch funktionelle Komplementation ermöglichen.